

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

FERNANDA BARBOSA BORGES JARDIM

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA
LÁCTEA PROBIÓTICA
CARBONATADA: CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS**

Araraquara – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA
LÁCTEA PROBIÓTICA
CARBONATADA: CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS**

Fernanda Barbosa Borges Jardim

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
Orientadora

Prof. Dr. Elizeu Antônio Rossi
Co-orientador

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Alimentos e
Nutrição da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Araraquara para obtenção do
título de Doutora em Alimentos e
Nutrição

Araraquara – SP

2012

Ficha Catabográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

J37 Jardim, Fernanda Barbosa Borges
Desenvolvimento de bebida láctea probiótica carbonatada :
características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais / Fernanda
Barbosa Borges Jardim. – Araraquara, 2012
128 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Alimentos e Nutrição

Orientador: Célia Maria de Sylos
Coorientador: Elizeu Antônio Rossi

1. Bebidas fermentadas. 2. Carbonatação. 3. Microbiologia. 4.
Proteólise. 5. Sensorial. I. Sylos, Célia Maria de, orient. II. Rossi, Elizeu
Antônio, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Sylos

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Prof^a. Dr^a. Daniela Peres Miguel

Prof^a. Dr^a. Sueli Ciabotti

A meus pais, Fernando e Vera, pelo apoio e amor incondicionais,
A meus irmãos, pela amizade e convívio,
A meu marido, José, pela paciência e amor presentes em nossa vida,
A minha filha, Ana Beatriz, amor eterno,
A meu filho, José, aguardado em um momento de intensa felicidade,
A Deus, pela fé e certeza de que todo o esforço é recompensado.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Célia Maria de Sylos, pela orientação, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Elizeu Antônio Rossi, pelo conhecimento compartilhado e orientação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participarem da defesa e pelas ricas contribuições ao trabalho.

Ao Laticínio Taigors, pelo apoio técnico e suporte financeiro.

Ao empresário, Joselito, pela sugestão do tema e confiança depositada em meu trabalho.

A Indústria de refrigerantes Golé, pelo suporte técnico.

Ao IFTM, pelo apoio irrestrito durante o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os colaboradores do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

A todos os colegas envolvidos nas etapas de desenvolvimento e finalização da tese.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVOS	8
REFERÊNCIAS	9
CAPÍTULO 1	11
REVISÃO DE LITERATURA	11
1 BEBIDAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS	12
2 TECNOLOGIA DE CARBONATAÇÃO APLICADA EM PRODUTOS LÁCTEOS ..	16
2.1 Histórico do mercado mundial de produtos lácteos carbonatados	18
2.2 Efeitos físico-químicos da carbonatação	19
2.3 Efeitos microbiológicos da carbonatação	26
2.4 Efeitos sensoriais da carbonatação	35
3 REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2	53
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA CARBONATADA: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
Introdução	56
Material e Métodos	58
<i>Material</i>	58
<i>Elaboração das bebidas lácteas</i>	58
<i>Métodos</i>	61
<i>Análises microbiológicas</i>	61
<i>Análises físico-químicas</i>	62
<i>Planejamento experimental e análise dos resultados</i>	64
Resultados e discussão	64
<i>Parâmetros microbiológicos</i>	64
<i>Parâmetros físico-químicos</i>	68
Conclusões	82
Referências	82

CAPÍTULO 3.....	88
VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM BEBIDA LÁCTEA CARBONATADA	88
RESUMO	89
ABSTRACT	90
Introdução.....	91
Material e Métodos.....	93
<i>Material</i>	93
<i>Elaboração das bebidas lácteas</i>	93
<i>Métodos</i>	95
<i>Contagem de bactérias lácticas</i>	95
<i>Planejamento experimental e análise dos resultados</i>	96
Resultados e Discussão	96
Conclusões	103
Referências	103
CAPÍTULO 4.....	108
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA CARBONATADA: CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS	108
RESUMO	109
ABSTRACT	110
Introdução.....	111
Material e Métodos.....	112
<i>Material</i>	112
<i>Elaboração das bebidas lácteas</i>	113
<i>Métodos</i>	115
<i>Análises sensoriais</i>	115
<i>Planejamento experimental e análise dos resultados</i>	115
Resultados e Discussão	116
Conclusões	125
Referências	125
CONCLUSÕES GERAIS.....	128

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida láctea sabor morango carbonatada e fermentada com bactérias probióticas. Foram elaboradas quatro formulações de bebida láctea: Controle (BL); Fermentada (BLF); Carbonatada (BLC) e Fermentada Carbonatada (BLFC). Nas amostras submetidas à carbonatação, utilizou-se um carbonatador para injeção do gás dióxido de carbono (CO₂) dissolvido em água potável, resultando em um produto com a proporção de 2: 1 (volume de gás/ volume de bebida láctea) e nas amostras fermentadas, adotou-se o cultivo constituído das bactérias lácticas *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® e *Streptococcus thermophilus*. As amostras foram caracterizadas quanto a parâmetros físico-químicos (composição química, índice de proteólise e teor de carbonatação), parâmetros microbiológicos (contagens de coliformes totais, *E. coli*, bolores e leveduras e viabilidade das bactérias lácticas) e aspectos sensoriais através de testes de aceitação e intenção de compra, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado das bebidas lácteas. As formulações de bebidas fermentadas BLF e BLFC apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação às amostras não fermentadas BL e BLC nos parâmetros glicídeos redutores em lactose e em sacarose, pH e índice de proteólise, com menores médias absolutas e acidez com maiores médias em todos os tempos estudados. As bebidas fermentadas BLF e BLFC não apresentaram presença de microrganismos contaminantes. A amostra BLC apresentou presença de leveduras e coliformes totais, mas as contagens indicaram que estava própria para o consumo no tempo 28 dias. Entretanto, a amostra controle (BL) apresentou contagens médias de coliformes totais acima do limite estabelecido pela legislação após 21 dias de estocagem refrigerada. A presença das bactérias lácticas e CO₂ e seus efeitos em menores índices de proteólise, menores valores de pH e maiores valores de acidez estiveram correlacionados com o efeito inibitório significativo de microrganismos contaminantes. O cultivo *Streptococcus* spp. manteve-se viável (contagens acima de 10⁷ UFC/mL) ao longo de todo período de armazenamento nas amostras BLF e BLFC; o gênero *Lactobacillus* spp. apresentou contagens acima de 10⁶ UFC/mL somente para a BLFC e o gênero *Bifidobacterium* spp. alcançou contagens inferiores a 10⁶ UFC/mL nas bebidas em todos os tempos analisados. A carbonatação não foi estimulatória do crescimento dos cultivos lácticos, principalmente nos grupos *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus* spp.. Os resultados sensoriais de aceitação indicaram que para cor, textura, sabor, acidez e refrescância, o teste de Friedman

foi significativo ($p < 0,05$) e para aroma, o teste foi não significativo. No tempo 7 dias, houve uma preferência geral pelas bebidas não carbonatadas BLF e BL e no tempo 21 dias, houve maior preferência pela BLF, mas se observou um aumento da aceitação pela amostra BLC. Os resultados do teste de intenção de compra indicaram valores superiores para BLF e menores percentuais para BL. A bebida BLF apresentou maior aceitação sensorial em todos os testes efetuados, entretanto as bebidas carbonatadas apresentaram resultados positivos, com potencial inserção da carbonatação como diferencial sensorial em bebidas lácteas. Novos estudos devem ser conduzidos com a tecnologia de carbonatação em bebidas lácteas, uma vez que comprovadamente houve correlação da presença de CO_2 com efeito inibitório de deteriorantes e menores alterações físico-químicas em bebidas lácteas.

Palavras-chave: Bebidas fermentadas, Carbonatação, Microbiologia, Proteólise, Sensorial.

ABSTRACT

The goal of this work was to develop a strawberry flavored dairy beverages carbonated and fermented with probiotic bacteria. Four formulas of dairy beverages were elaborated: Control (BL); Fermented (BLF); Carbonated (BLC) and Carbonated Fermented (BLFC). In samples submitted for carbonation, a carbonator was used for the carbon dioxide (CO₂) gas injection dissolved in drinking water, resulting in a product with a ratio of 2:1 (volume of gas volume of dairy beverages) and the cultivation consisting of lactic bacteria *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® and *Streptococcus thermophilus* was employed on the fermented samples. The samples were characterized by physical and chemical parameters (chemical composition, proteolysis index and carbonation proportion), microbiological parameters (total coliform counts, *E. coli*, yeasts and molds and viability of the lactic bacteria) and sensory aspects through acceptance testing and purchase intention, over the course of 28 days of refrigerated storage of the dairy beverages. The formulations of the BLF and BLFC fermented drink presented significant differences ($p < 0,05$) in relation to the non-fermented samples BL and BLC in glucides reducer of lactose and sucrose parameters, pH and proteolysis index, with lower absolute averages and acidity with higher averages at all studied times. The fermented beverages BLF and BLFC did not show any presence of contaminating microorganisms. The BLC sample showed the presence of yeasts and coliform counts, but the counts indicated that it was suitable for consumption in 28 days time. However, the sample control (BL) presented average coliform counts above the limit established by the law after 21 days of refrigerated storage. The presence of lactic bacteria and CO₂ and their effects on lower proteolysis indexes, lower pH values and higher acidity values were correlated with significant inhibitory effect of contaminated microorganisms. *Streptococcus* spp. cultivation remained viable (counts above 10⁷ CFU/mL) throughout the storage period in the samples BLF and BLFC; the genus *Lactobacillus* spp. presented counts above 10⁶ CFU/mL only for the BLFC sample and the genus *Bifidobacterium* spp. beverages reached counts less than 10⁶ CFU/mL at all times analyzed. The carbonation was not stimulatory for the growth of lactic crops, mainly in the groups *Bifidobacterium* spp. and *Streptococcus* spp.. The results of sensory acceptance indicated that for color, texture, flavor, acidity and freshness, the Friedman's test was significant ($p < 0.05$) and the test was not significant for the aroma. In a period of 7 days, there was a general preference for the BL and BLF non-carbonated beverage and in 21 days, there was greater preference for the BLF sample, but

an increasing acceptance of the BLC sample was noticeable. The purchase intention test results indicated higher values for BLF and lower percentages for BL. The BLF drink presented greater sensory acceptance in all tests performed, however the carbonated beverages presented positive results, with potential inclusion of the carbonation as sensory differential in dairy beverages. Further studies should be conducted with the technology of carbonation in dairy beverages, since it has been proven the correlation of the presence of CO₂ with inhibitory effect of contaminated microorganisms and lower physical and chemical changes of dairy beverages.

Keywords: Fermented Beverage, Carbonation, Microbiology, Proteolysis, Sensorial.

INTRODUÇÃO GERAL

A procura do consumidor por alimentos mais saudáveis, inovadores, seguros e de prática utilização, aliada à consolidação deste perfil de produtos no mercado, contribuíram para o crescimento da indústria de bebidas lácteas, fazendo com que estas ganhassem popularidade (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002).

O soro de leite é o líquido residual obtido a partir da coagulação enzimática do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína. É considerado um subproduto da indústria de laticínios e na sua composição encontram-se quantidades significativas de excelentes componentes como a lactose e proteínas de elevado valor biológico. Segundo SISO (1996), o soro representa 85 a 95% do volume inicial do leite e contém, aproximadamente, 55% do total de nutrientes do leite. A utilização de soro de queijo na elaboração de bebidas lácteas constitui-se numa forma racional e sustentável de aproveitamento deste produto secundário.

A participação da bebida láctea no mercado tem se ampliado devido às suas características, tais como: valor nutricional com a presença de cálcio e proteínas de alto valor biológico; papel dos componentes bioativos e de bactérias lácticas para a saúde; custo baixo do produto para o fabricante e preço final acessível para o consumidor (FERREIRA, 1997; 2002; NIELSEN, 1997; SANTOS; FERREIRA, 2001; UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL-USDEC, 2002).

Em especial, algumas bebidas lácteas fermentadas contêm microrganismos probióticos, que conferem um efeito de modulação e ativação de processos metabólicos, melhorando as condições de saúde. Entre os potenciais valores nutritivos exercidos por este grupo constam: controle e estabilização da microbiota intestinal; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos e ação antagônica através da produção de ácidos acético e láctico, de

bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; melhor utilização da lactose e promoção da digestão do açúcar em indivíduos intolerantes a lactose; estimulação e modulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas; melhora na digestibilidade; ação anticarcinogênica; ação hipocolesterolêmica (MARTEAU; RAMBAUD, 1993; YAESHIMA, 1996; SAAD, 2006).

Como forma de agregar valor a bebidas lácteas, surge como alternativa a técnica de carbonatação, comumente aplicada em águas e refrigerantes. A presença de dióxido de carbono (CO₂) dissolvido no produto possui propósitos sensoriais, conferindo às bebidas características de efervescência e refrescância e funciona como apelo para pessoas que procuram produtos inovadores. O CO₂ dissolvido é um componente natural do leite fresco que subsequentemente é perdido durante o transporte e processamento. Há um amplo espectro de utilização da carbonatação por ser um método simples, barato, reconhecido como seguro e viável em produtos lácteos (MERMELSTEIN, 1997; RAVINDRA et al., 2011).

O uso de conservadores antimicrobianos tem sido desencorajado pela percepção de riscos tóxicos apresentados por alguns destes aditivos. O CO₂ é intrínseco ao leite e atua seletivamente na inibição de contaminantes; entretanto, o mecanismo preciso de sua atividade ainda não é totalmente compreendido. Tecnologias comerciais que incorporam o CO₂ em embalagens com atmosferas modificadas ou através de injeção direta nos produtos são estratégias para ampliar a vida útil e melhorar a qualidade de produtos lácteos, como leites cru e pasteurizado, queijos, iogurtes e bebidas fermentadas (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006; SINGH et al., 2011)

As bebidas carbonatadas a base de leite ou com adição de leite surgiram primeiramente no Japão em 1919 e vêm ganhando projeção no mercado até hoje, principalmente no continente asiático (China, Japão) e Estados Unidos (EUA). O grande

apelo de mercado é a oferta de um produto diferente, saudável, rico em cálcio, refrescante, atrativo para os não consumidores de leite e flavorizado com sabores diversos, principalmente frutas cítricas (morango, laranja, limão, frutas vermelhas). As embalagens também foram sendo aperfeiçoadas e hoje existe a tendência de utilização de materiais como alumínio e garrafas PET (polietileno tereftalato) (FOODBEV, 2009; MILKPOINT, 2009).

No Brasil, até o momento, não foram lançadas comercialmente bebidas a base de leite carbonatadas e a literatura sobre o tema é bastante escassa. Diante da perspectiva da adição de CO₂ em produtos lácteos funcionais, é pertinente o desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada e carbonatada e a análise de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- **Geral:** Desenvolver uma bebida láctea sabor morango carbonatada e fermentada com bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e probióticas *Lactobacillus acidophilus*-LA-5® e *Bifidobacterium* BB-12®.
- **Específicos:** a) Caracterizar diferentes formulações de bebidas lácteas quanto a parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável, umidade, gordura, cinzas, carboidratos, nitrogênio total, nitrogênio não protéico, nitrogênio solúvel), b) Determinar os efeitos da carbonatação e das bactérias lácticas em relação aos índices de proteólise das formulações de bebidas lácteas, c) Avaliar as ações do CO₂ e das bactérias lácticas como inibidores dos microrganismos contaminantes bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli* em formulações de bebidas lácteas d) Analisar o efeito da carbonatação na viabilidade das bactérias lácticas das formulações de bebidas lácteas fermentadas, e) Avaliar sensorialmente a aceitação e intenção de compra das formulações de bebidas lácteas.

REFERÊNCIAS

FERREIRA, A. C. Breve história e perspectivas para a indústria de laticínios no Brasil. **2º Simpósio de Tecnologia de Produtos Lácteos – Germinal**, 2002.

FERREIRA, A. C. Tendências mercadológicas de produtos lácteos fermentados e bebidas lácteas. In: LERAYER, A. L. S., SALVA, T. J. G. (coords.). **Leites fermentados e bebidas lácticas**. Campinas: ITAL, p. 7.21-7.40, 1997.

FOODBEV. **A History of carbonated milk drinks**. Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.foodbev.com/gallery/a-history-of-carbonated-milk-drinks>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, v. 5, n. 4, p. 158-168, 2006.

LIMA, S. M. C. G.; MADUREIRA, F. C. P.; PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas: nutritivas e refrescantes. **Milkbizz Tecnol.**, v. 1, n. 3, p. 4-11, 2002.

MARTEAU, P. E.; RAMBAUD, J. C. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 12, p. 207-220, 1993.

MERMELSTEIN, N. H. Extending dairy products shelf life with CO₂. **Food Technol.**, v. 51, p. 72-76, 1997.

MILKPOINT. **Coca-cola lança leite com gás nos EUA**. Jul. 2009. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mercado/marketing-do-leite/cocacola-lanca-leite-com-gas-nos-eua-55722n.aspx>>. Acesso em: 11 nov. 2011.

NIELSEN, A. C. Tendência do mercado de iogurtes e bebidas lácteas: evolução dos segmentos. In: LERAYER, A. L. S., SALVA, T. J. G. (coords.). **Leites fermentados e bebidas lácteas**. Campinas: ITAL, p. 2.11-2.25, 1997.

RAVINDRA, M. R.; RAO, K. J.; NATH, B. S.; RAM, C. Extended shelf life flavoured dairy drink using dissolved carbon dioxide. **J. Food Sci. Technol.**, 03 ago. 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/m6213634u159uq67/fulltext.pdf> >. Acesso em: 26 nov. 2011.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Rev. do Inst. de Lat. Cândido Tostes**, v. 56, n. 3, p. 44-50, 2001.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A. A.; LANGOWSKI, H. C. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. **Int. J. Dairy Technol.**, v. 64, p. 1-17, 2011.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.

USDEC – UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Características, funções e novas aplicações das proteínas de soro e suas novas frações. **Food Ingredients**, n. 17, p. 50-56, 2002.

YAESHIMA, T. Benefits of bifidobacteria to human health. **Bull. Int. Dairy Fed.**, v. 313, p. 36-42, 1996.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 BEBIDAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS

A fermentação láctica constitui em uma das formas mais antigas de conservação de alimentos, estando principalmente relacionada com a obtenção de produtos como queijo, iogurte, bebidas lácteas e manteiga (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

Segundo relatório intitulado "Best of Times, Worst of Times: Global Beverage Outlook 2012", em que o banco Rabobank faz uma previsão para o mercado global de bebidas em 2012, os autores escreveram que a demanda mundial por bebidas de proteínas e funcionais levou a uma explosão nas criações de novos produtos. A convergência entre os setores de refrigerantes e bebidas lácteas continua atraindo companhias globais de bebidas, como Coca-Cola, PepsiCo, Suntory e Danone (MILKPOINT, 2012)

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas fermentadas especifica que estas são produtos lácteos resultantes da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingrediente. O produto é fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia por grama) no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

Há interesse na adição de bactérias lácticas probióticas em bebidas lácteas e uma grande variedade de produtos que contêm estes microrganismos em suas formulações

(KNEIFEL; PACHER, 1993; GOMES; MALCATA, 1999; ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004; CUNHA et al., 2008). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios aos seus consumidores (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2002). Eles são bactérias Gram positivas e estão incluídas primariamente em dois gêneros, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (HOLZAPEL et al., 1998; KLEIN et al., 1998).

As bactérias pertencentes a este grupo possuem a particularidade de tolerância a ácido e bile, o que possibilita a sobrevivência ao trato intestinal, proporcionando o controle da microbiota intestinal e mantendo a saúde. *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. são exemplos de bactérias que possuem este perfil (DAVE; SHAH, 1997; OSTLIE; TREIMO; NARVHUS, 2005)

Os efeitos benéficos dos probióticos podem estar vinculados ao aumento do metabolismo de lactose, à atividade antimicrobiana e anticarcinogênica, à proteção contra distúrbios gastrintestinais, à diminuição dos níveis de colesterol, à manutenção do balanço gastrintestinal, à atividade e à estimulação da resposta imune (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997; SCALABRINI et al., 1998; CHOU; HOU, 2000; AWAISHEH; HADDADIN; ROBINSON, 2005; DOLEYRES; LACROIX, 2005; MADUREIRA et al., 2005)

Os efeitos funcionais de alimentos adicionados de microrganismos probióticos para a saúde humana e, em particular produtos lácteos direcionados para crianças e populações de risco, têm sido promovidos pelos profissionais de saúde. São reportados que os probióticos exercem um importante papel nas funções imunológicas, digestivas e respiratórias e podem ter efeito de minimizar doenças infecciosas em crianças (FAO; WHO, 2001). Como exemplos, consta o efeito benéfico do uso das cepas *Lactobacillus*

rhamnosus GG e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 na prevenção (SAAVEDRA et al., 1994; SZAJEWSKA et al., 2001) e tratamento (ISOLAURI et al., 1991; GUARINO et al., 1997; MAJAMAA et al., 1995; SHORNIKOVA et al., 1997; PERDONE et al., 1999; GUANDALINI et al., 2000) de diarreia aguda causada por rotavírus em crianças. Também, as mesmas cepas foram responsáveis pela modulação da resposta imune e prevenção de doenças alérgicas provocadas pelo leite bovino ingerido por crianças (MAJAMAA; ISOLAURI, 1996; 1997; ISOLAURI et al., 2000).

Para a produção de benefícios funcionais, é sugerido um mínimo de 10^5 a 10^6 UFC/mL de bactérias probióticas em alimentos (SAMONA; ROBINSON, 1994). MARTINEZ-VILLALUENGA et al. (2006) afirmam que o valor de 10^6 UFC/mL de bactérias probióticas seria o menor limite estipulado pelo *International Standard IDF/FIL* para um produto ser considerado probiótico. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2008), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

Outro fator a considerar, para que um produto seja considerado probiótico, é que o alimento deve conter uma ou mais cepas bem definidas, uma vez que os efeitos probióticos são específicos para determinadas cepas em especial. Assim sendo, a validação da função probiótica ou o monitoramento do impacto probiótico de uma preparação de microrganismos com composição desconhecida é cientificamente inaceitável (SANDERS, 2003).

Para uso em alimentos, os microrganismos probióticos devem não apenas ser capazes de sobreviver pela passagem do trato intestinal, mas também devem ter a capacidade de se proliferarem no intestino. Isto significa que eles devem ser resistentes ao

suco gástrico e serem capazes de se multiplicarem na presença da bile no intestino, ou serem consumidos em alimentos que permitam sua sobrevivência na passagem pelo estômago e exposição à bile (HOLZAPPEL et al., 1998; KLEIN et al., 1998). LIN et al. (2006) salientam que poucos produtos comerciais probióticos atendem o requisito de suas bactérias lácticas apresentarem aderência ao trato intestinal de adultos.

A produção de bebidas fermentadas de elevada qualidade contendo células viáveis de probióticos é um desafio que se coloca à indústria alimentar, pois se tratam de organismos que se multiplicam lentamente, implicando em fermentações longas e invariavelmente exigência de anaerobiose. As bifidobactérias produzem ácido acético e láctico (nas proporções molares de 3:2) durante a fermentação o que pode criar importantes restrições sensoriais, resultando em uma aceitação limitada por parte dos consumidores (HOIER, 1992).

Muitas publicações referem como alternativa potencial, o uso de culturas combinadas de *Bifidobacterium* spp. com *Lactobacillus acidophilus* ou com culturas de outras bactérias lácticas como o *Streptococcus thermophilus* (HOIER, 1992; GOMES et al., 1995; GOMES; MALCATA, 1999; SAMONA; ROBINSON; MARAKIS, 1996); algumas das vantagens oriundas desta solução incluem melhores taxas de crescimento, redução do tempo de fermentação, ausência de certos defeitos sensoriais e aumento do valor nutritivo dos produtos finais.

Apesar do leite ser um meio rico do ponto de vista nutricional, as bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido principalmente à falta de atividade proteolítica (KLAVER; KINGMA; WEERKAMP, 1993). O leite é um meio satisfatório por conter nutrientes essenciais, porém aminoácidos e pequenos peptídios estão presentes em quantidades insuficientes, por exemplo, para o crescimento de bifidobactérias (GOMES; MALCATA, 1999). MISRA e KULIA (1992) complementam que leites

fermentados com bifidobactérias possuem um tempo de incubação prolongado a temperatura de 37°C devido ao seu lento crescimento e o produto, conseqüentemente, apresenta-se fracamente ácido (FONDEN; HOLGERSSON, 1985; MISRA; KUILA, 1992). Com isso, aumenta-se o risco de proliferação de microrganismos indesejáveis (NORIEGA et al., 2003).

A incorporação de micronutrientes como peptídeos e aminoácidos e de outros fatores de crescimento pode ser necessária para reduzir o tempo de fermentação e propiciar viabilidade às bactérias probióticas (OLIVEIRA et al., 2002). A adição de CO₂ em bebidas lácteas fermentadas promoveu a redução do tempo de fermentação destes produtos sem efeitos significativos em suas propriedades sensoriais, assim como nas culturas *starters* (VINDEROLA et al., 2000; GUEIMONDE; REYES-GAVILAN, 2004).

Neste contexto, o estudo de novas tecnologias em produtos lácteos fermentados, visando melhorias no processamento e o aumento da viabilidade de probióticos, tem recebido atenção dos pesquisadores (VINDEROLA et al., 2000).

2 TECNOLOGIA DE CARBONATAÇÃO APLICADA EM PRODUTOS LÁCTEOS

Diante de vários desafios no setor lácteo, existe espaço para inovações no mercado como os produtos lácteos fermentados e carbonatados, pois combinam o efeito benéfico à saúde e sensação sensorial de refrescância proporcionada pelo CO₂ (KARAGÜL-YÜCEER et al., 1999). A carbonatação é um processo viável e seguro e aparentemente não produz efeitos negativos sobre o leite e seus derivados. O CO₂ é um antimicrobiano natural, apresentando uso potencial na indústria láctea porque possui a opção de ser adicionado e depois removido de leite e derivados sem efeitos deletérios (FAIRBAIRN; LAW, 1986; SINGH et al., 2011).

Diferentes métodos podem ser usados para adição de CO₂ aos produtos, como a adição de água carbonatada, adição de carbonatos, embalagens com atmosfera modificada e injeção direta de CO₂. No caso de produtos de elevada viscosidade como leites fermentados, o processo de injeção do CO₂ na forma gasosa é sugerido como a melhor forma de processamento. O CO₂ tem sido empregado como alternativa, particularmente para a preservação de alimentos altamente perecíveis e alguns de maior valor agregado. (OGDEN, 1997; SINGH et al., 2011). A tecnologia apresenta inúmeras vantagens quando comparada ao processamento térmico (Tabela 1).

TABELA 1 – Comparação entre processamento térmico (pasteurização e esterilização) e processamento com uso de CO₂ (adição direta e embalagem com atmosfera modificada).

PROCESSAMENTO TÉRMICO	PROCESSAMENTO COM CO₂
Tecnologia cara, elevados custos de infraestrutura	Boa relação custo-benefício
Efeitos nutricionais, sensoriais e tecnológicos negativos	Manutenção das características físicas, nutricionais e sensoriais
Esterilização do leite afeta probióticos e estrutura das caseínas e proteínas do soro durante armazenamento	Mantém atividade de probióticos e nutrientes do leite durante armazenamento
Falhas de pasteurização são frequentes	Uso de CO ₂ em leite cru aumenta a letalidade do processo de pasteurização
Alterações na atividade enzimática	Modulação da atividade enzimática
Digestibilidade de leite pasteurizado é comprometida	Digestibilidade do leite é menos afetada

Fonte: Adaptada de SINGH et al. (2011).

A indústria de alimentos interessa-se em expandir o uso da tecnologia de adição do CO₂. Para viabilizar novas oportunidades, o aprofundamento de estudos do impacto da adição do CO₂ nos componentes do leite é fundamental (MA; BARBANO; SANTOS, 2003).

2.1 Histórico do mercado mundial de produtos lácteos carbonatados

No Japão, a bebida, denominada *Calpis*, foi comercializada pela primeira vez em 1919, sendo considerado o primeiro refrigerante com adição de leite. O nome do produto deriva da combinação de cálcio e “salpis”, palavra sânscrita que sugere o amadurecimento e fermentação do leite. A evolução de seu mercado permitiu o lançamento da *Soda Calpis*, disponível em uma variante zero caloria e novos sabores: gengibre e uva (FOODBEV, 2009).

Nos Estados Unidos (EUA), em 2001, foi comercializado o leite carbonatado da empresa BevNet, denominado *White Soda*, nos sabores limão/baunilha e morango, dirigido para uma faixa etária de 5 a 17 anos, especialmente às crianças que não apreciam leite. Também, em 2001, nos EUA, foi inserida a bebida *E-moo*, bebida carbonatada a base de leite, pela empresa *Mac Farms Inc.* de Burlington, Massachusetts. O apelo foi de “uma bebida para crianças de uma era da internet”, sendo comercializada em três sabores: laranja, chiclete e chocolate/frutas vermelhas (BEVNET, 2001; FOODBEV, 2009).

Em 2004, o Reino Unido apresentou um leite carbonatado, denominado *Soda Freekee*, com os sabores Morango e Laranja, visando um público infantil de 10 a 13 anos. Em 2005, a Coreia do Sul lançou a bebida *Milkis* nos sabores laranja e morango. Em 2006, nos EUA, foi comercializada a bebida carbonatada com adição de leite *Kool Cow* nos sabores morango e pêssigo/manga em garrafas PET (polietileno tereftalato). Na França, em 2008, foi apresentada a bebida carbonatada com adição de leite denominada *Dizzy*, em garrafa de alumínio roxa nos sabores citrus e frutas exóticas. Porém, o produto teve problemas em 2009 quando a empresa Coca-Cola ganhou uma batalha legal devido a quebra de patente (FOODBEV, 2009).

Lançada em 2008 no Japão, a bebida *White Pepsi & Yogurt Flavor* é considerada um refrigerante com sabor de iogurte. Outro produto no Japão, que não se enquadra na

categoria de leite carbonatado, foi o a bebida carbonatada “queijo líquido”, fabricado pela empresa *Needs Cheese Factory*, própria para ser usada como molho de salada. Em 2009, foi lançada a bebida *Minute Maid Super Milky drink* – uma mistura de suco de fruta, soro de leite em pó e flocos de coco- nas províncias de Pequim pelo grupo Coca-Cola. A bebida foi criada no Centro Global da fabricante de bebidas de Inovação Tecnológica em Xangai (FOODBEV, 2009).

Nos Estados Unidos, na cidade de Nova York em 2009, a Coca-Cola apresentou a bebida carbonatada com adição de leite chamada *Vio*, acondicionada em garrafa de alumínio, contendo na formulação aromas e corantes naturais, leite desnatado, creme de leite e sacarose. A bebida contém 15% da ingestão diária recomendada para cálcio e é encontrada nos sabores pêssigo/manga, frutas cítricas, cola e cereja. A empresa pretende ampliar o mercado na América do Norte, Europa e alguns mercados em desenvolvimento (MILKPOINT, 2009).

2.2 Efeitos físico-químicos da carbonatação

Em combinações específicas de pressão e temperatura o CO₂ efetivamente precipita as proteínas do leite. A precipitação de proteínas ocorre quando o pH do leite é reduzido abaixo do ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6). A adição de CO₂ ao leite leva à formação de ácido carbônico e decréscimo dos valores de pH; entretanto, pressurização com CO₂ pode causar precipitação de caseínas em valores de pH mais elevados do que o ponto isoelétrico (TOMASULA; BOSWELL, 1999). Outros efeitos da carbonatação seriam o aumento da viscosidade do leite e redução do tamanho das micelas de caseína (CHANG; ZHANG, 1992).

As proteínas em leites carbonatados não são estáveis quando submetidas ao tratamento térmico. Leites carbonatados não podem ser pasteurizados pelos métodos usuais

industriais, porque ocorre a precipitação de proteínas quando o leite é submetido a 60°C por 30 minutos. O recomendável é a adoção das condições de 60°C por 15 minutos para que as proteínas se mantenham estáveis em solução. Nestas condições, a quantidade de caseína do soro reduz-se e há um aumento da concentração de caseína micelar (CHANG; ZHANG, 1992). Porém, vale ressaltar que estas condições de temperatura e tempo não atendem as exigências do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, que exige no caso de pasteurização lenta, o binômio temperatura x tempo de 62 a 65°C por 30 minutos (BRASIL, 2005).

CHANG e ZHANG (1992) mostraram que a distribuição das caseínas em leites carbonatados seguia um padrão de liberação da caseína da micela em pH baixos e 4°C. O fator pH, portanto, pode ser considerado como o maior fator na mudança da distribuição das caseínas, porém, a combinação de outros fatores como a distribuição de sais e a pressão, provavelmente, são mecanismos que explicam também este fenômeno. A pressão aplicada na carbonatação provocou mudança na composição e distribuição das frações de caseína micelar e do soro em leites carbonatados.

CALVO e DERAFAEL (1995) sugeriram que o CO₂ deveria ser removido antes da pasteurização para minimizar a formação de depósitos nas paredes do pasteurizador. MA e BARBANO (2003) analisaram o comportamento do pH de leite submetido a tratamento com 0 a 54 mM de CO₂ durante a pasteurização. Os valores de pH decresceram a medida em que se aumentavam a pressão e a concentração de CO₂; a uma concentração fixa de CO₂, o efeito da pressão na diminuição do pH do leite foi maior em tratamentos térmicos com temperatura mais elevadas, enquanto a uma temperatura fixa, o efeito da pressão em relação ao decréscimo do pH do leite foi maior em tratamentos com concentrações mais elevadas de CO₂. Concluíram que as condições de pressão e temperatura de pasteurização,

bem como a concentração inicial de CO₂ no leite, são importantes parâmetros de controle para prevenir a degradação do leite durante o tratamento térmico.

CALVO e BALCONES (2001) constataram um aumento da agregação de caseína quando se aumentava a pressão aplicada ao leite por um tempo determinado. Diante disso, observaram que qualquer estratégia do uso de CO₂ deve levar em conta os efeitos adversos de precipitação de proteínas. Uma das maneiras encontradas para reverter este fenômeno seria a aplicação de CO₂ ao leite, com posterior remoção a partir de técnicas como aplicação de vácuo (MA et al., 2001).

RUAS-MADIEDO et al. (1996) reportaram os resultados de estudo em escala piloto em que CO₂ foi aplicado em leite cru até atingir pH de 6,0 ou 6,2. O leite foi mantido a 4°C por quatro dias e, posteriormente, houve a aplicação de vácuo para remoção de CO₂, seguida da pasteurização. Não houve mudanças nas estruturas das proteínas caseína e do soro e no conteúdo de ácidos orgânicos, com exceção da concentração de ácido láctico, que foi ligeiramente menor no leite tratado com CO₂. A acidez volátil das amostras de leite tratadas com CO₂ foi menor, presumivelmente pela menor atividade microbiana.

RAOUCHE et al. (2007) analisaram a estabilidade da micela de caseína sujeita a acidificação com CO₂ reversível e o impacto no tempo e estocagem refrigerada. O CO₂ foi injetado a 4°C em leite com pH 6,63 até pH 5,5 ou 5,2 por 15 ou 60 minutos para depois retornar ao estado inicial através de neutralização (aplicação de vácuo). Não houve mudanças na estrutura da caseína e nas propriedades reológicas do gel, porém houve um aumento da hidratação da micela após neutralização e estocagem.

Outro efeito físico-químico relacionado com a adição de CO₂ em leite e derivados seria a redução do pH do meio. BEAULIEU; POULIOT; POULIOT (1999) utilizaram concentrações de CO₂ variando de 0 a 54 mM resultando em decréscimo do pH de leite

carbonatado durante a pasteurização em resposta ao aumento da pressão e da concentração do gás. A utilização de 600 a 2400 ppm de CO₂ em leite seguido dos processos de aquecimento e pressurização também provocou a redução do pH a medida em que se aumentava as concentrações de CO₂ (MA; BARBANO, 2003; MA et al., 2001).

Muitos estudos têm focado no efeito do CO₂ na qualidade microbiológica do leite. Entretanto, baixas contagens de bactérias, isoladamente, não garantem qualidade superior ao leite. A indústria láctea também se preocupa com a deterioração dos componentes do leite resultante de reações de lipólise e proteólise, o que reduz o valor econômico do leite e causa impacto negativo na funcionalidade de proteínas, especialmente as caseínas. Proteólise pode reduzir o rendimento de queijos (BARBANO; RASMUSSEN; LYNCH, 1991; KLEI et al., 1998) e resultar em sabor amargo (MA et al., 2000) em produtos lácteos. Como o CO₂ é mais solúvel que o O₂, sua presença provoca o deslocamento do O₂ do meio, minimizando várias reações de degradação (HOTCHKISS; CHEN, 1996).

CHOI e KOSIKOWSKI (1985) avaliaram o índice de proteólise em iogurtes carbonatados com 0,5 kg/cm² de CO₂ e não carbonatados, a partir da determinação do teor de proteína solúvel. Os teores na bebida carbonatada aumentaram relativamente pouco nos 30 dias de estocagem refrigerada, enquanto os teores aumentaram marcadamente nas bebidas não carbonatadas após 10 dias de estocagem. Os autores recomendaram que é necessária a prévia homogeneização do iogurte antes da carbonatação para que o efeito de partículas menores distribuídas na solução colabore para a estabilidade física e minimize a separação do soro na bebida.

Os efeitos físico-químicos da adição direta de CO₂ ao leite cru com posterior decarbonatação e pasteurização foram investigados. O CO₂ (14,8 a 22,7 mM) foi incorporado ao leite cru e este foi mantido a 4°C por 10 dias antes da remoção do CO₂ e subsequente pasteurização rápida e estocagem a 6°C por 30 dias em garrafas de polietileno

de alta densidade. Houve decréscimo de proteólise e lipólise no leite pasteurizado previamente tratado com CO₂ (THONGOUPAKARN, 2001).

MA; BARBANO; SANTOS (2003) investigaram amostras de leite submetidas à carbonatação contendo de 0 (controle, pH de 6,9) a 1500 ppm (pH 6,2) de CO₂ e demais amostras de leite foram acidificadas com HCl (ácido clorídrico) até pH 6,2. As amostras de leite foram armazenadas a 4°C e avaliadas em 0, 7, 14 e 21 dias com as análises de proteólise e lipólise. Comparados com o controle, os leites carbonatados com 1500 ppm de CO₂ e acidificados com HCl, apresentaram menos proteólise. Altos níveis de proteólise e lipólise nos leites não carbonatados estiveram relacionados com maiores contagens bacterianas totais. Nas amostras de leite carbonatados, a proteólise e lipólise foram resultantes de enzimas endógenas no leite. Os autores observaram que a influência do CO₂ no decréscimo da proteólise pode ser explicada por pelo menos dois mecanismos: a redução das proteases de origem microbiana devido à redução da multiplicação bacteriana e a possível redução da atividade de proteases endógenas devido aos baixos valores de pH. Por outro lado, o efeito da carbonatação ou da acidificação na lipólise do leite não foi significativa. Concluíram que alta qualidade de leite cru com adição de 1500 ppm de CO₂ pode ser alcançada em condições de refrigeração a 4°C por 14 dias com o mínimo de proteólise.

VIANNA (2010) examinou o efeito da adição de dióxido de carbono (CO₂) sobre os índices de proteólise dos leites cru e UHT (*Ultra High Temperature*). A adição de CO₂ ao leite cru preservou sua qualidade físico-química durante o armazenamento refrigerado e afetou positivamente a manutenção da qualidade do leite UHT durante seu armazenamento. A adição de CO₂ ao leite cru refrigerado retardou o desenvolvimento microbiano e resultou em menores índices de proteólise e lipólise, relacionados à menor contagem de microrganismos psicotróficos neste leite. O leite cru adicionado de CO₂

apresentou melhor qualidade físico-química após 6 dias de armazenamento refrigerado, quando comparado ao leite não adicionado de CO₂. O leite UHT obtido a partir de leite cru adicionado de CO₂ apresentou menor proteólise e lipólise durante 120 dias de armazenamento. Em ambas as amostras, a hidrólise protéica deveu-se à ação de plasmina e de proteases microbianas, entretanto no leite UHT obtido a partir de leite cru adicionado de CO₂ observou-se menor quantidade de peptídeos liberados pela hidrólise por proteases microbianas.

A influência da carbonatação nos teores de lactose, galactose e glicose em leites fermentados adicionados de bactérias probióticas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Bifidobacterium bifidum*) foi investigada e relacionada com a atividade da β -galactosidase das culturas *starters*. Durante a incubação e primeiros dias de refrigeração a hidrólise da lactose resultou na formação de galactose e glicose nos leites fermentados CT (*Streptococcus thermophilus/Lactobacillus casei*), AT (*Streptococcus thermophilus/Lactobacillus acidophilus*) e ABT (*Streptococcus thermophilus/ Lactobacillus acidophilus/Bifidobacterium bifidum*). Durante a incubação os níveis de lactose e monossacarídeos não foram afetados pela carbonatação do leite. Entretanto, durante a estocagem refrigerada a presença deste gás esteve associada com o conteúdo ligeiramente menor de lactose e maiores níveis de galactose e glicose nos produtos AT e ABT, mas não nos leites fermentados com CT. Nos leites fermentados com CT, os níveis de atividade de β -galactosidase do *S. thermophilus* em pH de 6,5 (pH inicial das amostras não carbonatadas) e 6,3 (pH inicial das amostras carbonatadas) com a ausência da atividade da β -galactosidase do *L. casei* pode explicar a ausência de diferenças no conteúdo de glicose e galactose entre as amostras carbonatadas e não carbonatadas (GUEIMONDE et al., 2002).

Conforme GUEIMONDE et al. (2002), a carbonatação de leites pasteurizados pode ser uma ferramenta útil para reduzir o tempo de incubação dos produtos fermentados e

conseqüentemente reduzir os custos econômicos. Entretanto, o aumento da atividade metabólica dos microrganismos causada pelo CO₂ pode também modificar alguns parâmetros físico-químicos importantes destes produtos. Entre eles, glicose e galactose são de interesse particular, pois são produzidos a partir da hidrólise da lactose pela enzima de origem microbiana β-galactosidase, responsável pela melhora dos sintomas de intolerância à lactose.

RAVINDRA et al. (2011) desenvolveram uma bebida flavorizada a base de leite com dissolução de CO₂ para carbonatação. As bebidas carbonatadas e não carbonatadas foram avaliadas quanto às mudanças físico-químicas ao longo de 30 dias de armazenamento refrigerado. Na bebida carbonatada, foi observado o decréscimo de pH, provavelmente devido a dissolução do gás resultando na formação de ácido carbônico (RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005). Este fator pode ter contribuído para a maior acidez da bebida em relação ao controle. O aumento da acidez provocado pelo CO₂, entretanto, não afetou a estabilidade das amostras carbonatadas, reflexo da aceitação sensorial em relação ao atributo consistência. As amostras controle apresentaram aumento de seus valores de acidez durante o armazenamento. Houve um aumento discreto no pH das amostras carbonatadas até o 17º dia de estocagem, com redução posteriormente. A acidez das amostras carbonatadas aumentou ligeiramente até o 14º dia de armazenamento. Os autores também avaliaram os índices de lipólise e proteólise das bebidas, respectivamente, pelos teores de ácidos graxos livres e nitrogênio solúvel. As amostras carbonatadas apresentaram menores índices do que as amostras controle ao longo do armazenamento refrigerado.

2.3 Efeitos microbiológicos da carbonatação

O CO₂ pode ter efeito inibitório e favorável em bactérias. Os efeitos dependem da pressão parcial, tempo de aplicação, concentração de CO₂ e temperatura do meio (BLICKSTAD; ENFORS; MOLIN, 1981; SARANTÓUPOULOS et al., 1996); volume do gás no espaço livre, acidez, atividade de água do meio (SARANTÓUPOULOS et al., 1996; DAVIDSON; JUNEJA, BRANEN, 2001); tipo de produto alimentício, tipo e fase de crescimento do microrganismo (DAINTY, 1971; SARANTÓUPOULOS et al., 1996; OGDEN, 1997; DAVIDSON; JUNEJA, BRANEN, 2001).

Os mecanismos de inibição pelo qual o CO₂ afeta o desenvolvimento microbiano ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto, modos de ação foram propostos e resumidos por DANIELS; KRISHNAMURTHI; RIZVI (1985), LOSS; HOTCHKISS (2000); HOTCHKISS; WERNER; LEE (2006) e SINGH et al. (2011): a) substituição do O₂ pelo CO₂, desfavorecendo o crescimento de microrganismos aeróbicos; b) diminuição do pH e aumento da acidez do meio devido à dissolução do CO₂ e formação de ácido carbônico na fase aquosa do alimento (Figura 1); c) interferência direta nos processos enzimáticos dentro da célula; d) efeito direto sobre o metabolismo dos microrganismos.

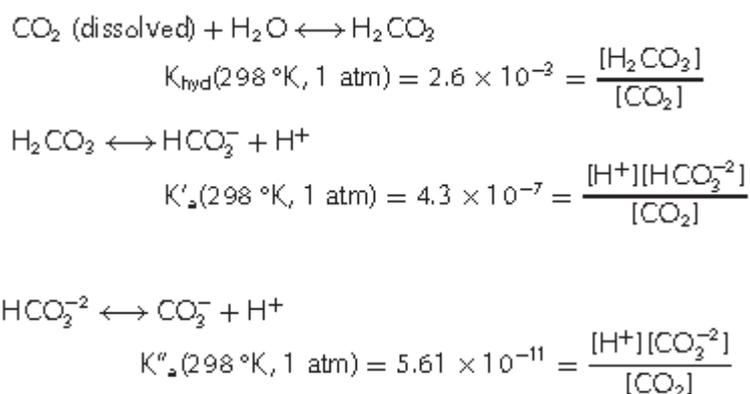


FIGURA 1 - Mecanismo de dissolução de dióxido de carbono (CO₂) e formação de ácido carbônico (H₂CO₃).

Fonte: HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006.

O mecanismo que provoca alterações no metabolismo de microrganismos está baseado na capacidade do CO₂ permear na camada lipídica da membrana celular, passando através dela e se concentrando no citoplasma, o que causa a diminuição do pH intracelular e o *stress* da célula. O organismo não consegue efetivamente equilibrar este pH e as enzimas internas são rompidas (WOLFE, 1980). O CO₂ atua no prolongamento da fase lag e no aumento do tempo de geração dos microrganismos, o que resulta numa menor velocidade de desenvolvimento, estendendo a vida de prateleira dos produtos aos quais foi adicionado (KING; MABBITT, 1982; RASHED; MEHANNA; MEHANNA, 1986; ROBERTS; TORREY, 1988; ESPIE; MADDEN, 1997; HOTCHKISS; CHEN; LAWLESS, 1999; MA; BARBANO; SANTOS, 2003; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003).

Relatos de uso do CO₂ em pressões elevadas como agente antimicrobiano em leite cru datam do início do século 20 (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006). HOFFMAN (1906) reportou que a adição de 50 atm de CO₂ reduziu as taxas de multiplicação microbiana em leite cru.

VAN SLYKE e BOSWORTH (1907) observaram que a presença de 10 atm de CO₂ implicou no retardo da fermentação láctica. O leite não tratado coagulou em 24 horas em temperatura ambiente, enquanto que no leite carbonatado, foi observada sua coagulação apenas após 72 horas. Sugeriram que melhores resultados de preservação do leite são alcançados quando o leite cru é tratado com CO₂ em tanques similares aos utilizados para bebidas carbonatadas. Outras pesquisas similares consideraram a relação entre CO₂ e atividade microbiana em leite cru (PRUCHA; BRANNON; AMBROSE, 1922; DONALD; JONES; MACLEAN, 1924; VALLEY; RETTGER, 1927).

KING e MABBITT (1982), MABBITT (1982) e LAW e MABBITT (1983) adicionaram 10 a 40 mM de CO₂ em leite cru desnatado e observaram que o aumento da

concentração do gás esteve relacionado com a inibição do crescimento microbiano. O efeito era intensificado como o aumento da solubilidade de CO₂ em temperaturas baixas de conservação do leite cru. As diferenças entre as contagens totais de microrganismos das amostras de leite cru controle e carbonatada foram superiores a 3 ciclos logarítmicos após seis dias de estocagem refrigerada.

ROBERTS e TORREY (1988) inocularam bactérias psicrotróficas em leite esterilizado e determinaram o impacto da adição de 20 a 30 mM de CO₂ no comportamento deste grupo, resultando em um aumento no tempo da fase lag e decréscimo no crescimento exponencial dos microrganismos. O CO₂ não favoreceu o crescimento de microrganismos anaeróbios e anaeróbios facultativos. Concluíram que a estocagem refrigerada de leite cru pode ser estendida em 1 a 3 dias pela adição de concentrações mínimas de CO₂. Outros estudos também constataram que a adição de CO₂ ao leite cru controlou o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos à temperatura de refrigeração (ESPIE; MADDEN, 1997; RUAS-MADIEDO et al., 1998; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003; VIANNA, 2010).

AMIGO; OLANO; CALVO (1995) investigaram o efeito da acidificação de leite cru com a redução do pH inicial de 6,7 para os valores 6,2 e 6,0, não determinando a concentração de CO₂ incorporada. O tratamento aumentou os tempos de geração e diminuiu as taxas de crescimento de algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* spp.

RUAS-MADIEDO et al. (1996) constataram que a aplicação reversível de CO₂ em leite cru até pH de 6,0 ou 6,2 resultou em menores contagens de coliformes totais e psicrotróficos em comparação com leite não tratado, após quatro dias de estocagem refrigerada. Sugeriram que o CO₂ poderia ser adicionado ao leite cru durante a estocagem como forma de inibição de deterioração microbiana e facilmente removido durante o processamento sem efeitos deletérios.

Segundo HOTCHKISS e LEE (1996), a adição de CO₂ (200 a 800 mg/kg) reduziu a deterioração de leite e a vida útil do produto aumentou de 50 a 100%. Os autores observaram que a vida útil de leites carbonatados depende da manutenção dos níveis de CO₂ no produto durante a estocagem com o uso de embalagens de alta barreira à passagem de gases.

O efeito de 30 e 45 mM de CO₂ na população microbiana de leite cru estocado a 6°C foi determinado, resultando em inibição de aeróbios totais, coliformes e psicrotóxicos, com exceção de *Lactobacillus* spp. A adição de CO₂ promoveu a extensão da qualidade de leite cru refrigerado (ESPIE; MADDEN, 1997).

Os efeitos microbiológicos da adição de CO₂ (14,8 a 22,7 mM) ao leite cru mantido a 4°C por 10 dias, com posterior descarbonatação, pasteurização rápida e estocagem a 6°C por 30 dias em garrafas de polietileno de alta densidade foram relatados por THONGOUPAKARN (2001). O leite cru tratado com CO₂ apresentou menores contagens microbianas, exibindo ainda menor taxa de multiplicação e maior tempo da fase lag após a pasteurização em comparação com o leite cru controle.

MARTIN; WERNER; HOTCHKISS (2003) detectaram o efeito inibitório do CO₂ em concentrações variando de 0,6 a 61,4 mM no crescimento de populações microbianas endógenas em leite cru e de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus licheniformis* inoculados em leite esterilizado, durante armazenamento a 15°C. Para cada microrganismo específico estudado, o CO₂ diminuiu a taxa de crescimento, com maior efeito em Gram-negativos em comparação com Gram-positivos. Os autores demonstraram que mesmo em temperatura superiores de refrigeração, o CO₂ pode reduzir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores em leite.

O efeito da carbonatação na microbiota do leite cru utilizando pressões de 68 a 689 kPA e temperaturas de 5; 6,1; 10 e 20°C foi investigado. Contagens padrão em placas foram significativamente menores em comparação com o padrão em todas as temperaturas e, em alguns casos, o tratamento foi bactericida. O tratamento a 689 kPA reduziu bactérias Gram-negativas e *Lactobacillus* spp. O tempo necessário para o leite cru com 689 kPA a 4°C alcançar 4,30 log₁₀ UFC/mL aumentou 4 dias quando comparado ao controle. Coliformes totais no leite carbonatado foram mantidos a 1,95 log₁₀ UFC/mL em 9 dias de tratamento enquanto as contagens do controle aumentaram significativamente até 2,61 log₁₀ UFC/mL em 4 dias e até 2,89 log₁₀ UFC/mL em 9 dias. Em 8 dias, contagens de *E. coli* não alteraram significativamente no leite carbonatado, mas aumentaram significativamente no controle. Contagens de bactérias termodúricas após 8 dias eram de 1,32 log₁₀ UFC/mL no leite carbonatado e 1,98 log₁₀ UFC/mL no controle. Estes resultados indicaram que manter o leite refrigerado e sob baixas pressões de CO₂ diminui as taxas de multiplicação de bactérias sem causar precipitação de proteínas. Portanto, a combinação de refrigeração e baixas pressões de CO₂ melhoram a qualidade microbiológica e a segurança de leite cru e pode ser uma efetiva estratégia para o transporte do leite para longas distâncias (RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005).

A adição de CO₂ em leite pasteurizado pode significar incremento da qualidade microbiológica, como em experimento de DUTHIE; SHIPE; HOTCHKISS (1986) em leite pasteurizado carbonatado, em que as contagens de psicotróficos e bactérias totais foram menores em relação ao leite pasteurizado controle. CHEN; HOTCHKISS; LAWLESS (1992) e HOTCHKISS; CHEN; LAWLESS (1999) chegaram a conclusões similares de que baixos níveis de CO₂ incorporados inibiram o crescimento de microrganismos psicotróficos e aumentaram moderadamente a vida útil de leite pasteurizado.

HOTCHKISS; CHEN; LAWLESS (1999) alcançaram resultados positivos na adição de CO₂ em concentrações de 8,7 a 21,5 mM em leite pasteurizado inoculado por microrganismos deterioradores. Houve o aumento do tempo da fase lag, menores taxas de crescimento e tempo superior para que os microrganismos atingissem a fase estacionária, significando um aumento de pelo menos 25 a 200% na vida útil dos leites pasteurizados carbonatados, sendo estes efeitos diretamente relacionados com a concentração de CO₂ no produto.

CHANG e ZHANG (1992) testaram três diferentes níveis de carbonatação (0,35; 0,70; 1,05 kg/cm²) para avaliar a eficiência na inibição de bactérias totais em leites reconstituídos. O tempo requerido para o número de colônias atingir a ordem de 10⁶ UFC/mL foi praticamente a mesma em todos os níveis de carbonatação, indicando que o nível de 0,35 kg/cm² poderia ser considerado ótimo para o propósito de preservação do leite. Entretanto, a atividade do CO₂ foi observada apenas em temperaturas de refrigeração. O leite carbonatado, armazenado em temperatura ambiente, deteriora-se na mesma velocidade que o leite pasteurizado não carbonatado.

O desenvolvimento de bolores e leveduras pode ser o principal determinante da vida útil de iogurtes (ROBINSON; TAMIME; WSZOLEK, 2002; VILJOEN et al., 2003). TAMIME e DEETH (1980) constataram que a injeção de CO₂ ou N₂ é uma alternativa viável como método de extensão da vida útil de iogurtes saborizados com frutas, com a inibição do crescimento de bolores e leveduras em iogurtes. CHOI e KOSIKOWSKI (1985) constataram o não crescimento de bolores e leveduras em iogurtes carbonatados em 80 dias de estocagem das amostras armazenadas a 4,4 e 10°C e na bebida controle, após 40 dias de estocagem, as contagens destes microrganismos foram de 1 x 10² UFC/g e 2 x 10² UFC/g, respectivamente, nas amostras armazenadas a 4,4 e 10°C.

RAVINDRA et al. (2011) desenvolveram uma bebida pasteurizada a base de leite com dissolução de CO₂ nas condições de 50 psi por 30 segundos e avaliaram as mudanças microbiológicas das amostras ao longo de 30 dias de estocagem refrigerada. A carbonatação das bebidas inibiu o crescimento apenas dos microrganismos psicrotróficos e não dos microrganismos mesófilos (contagem total em placas).

A sobrevivência de microrganismos probióticos é de fundamental importância em alguns produtos como iogurtes. Tecnologias que prolonguem a vida útil devem levar em consideração os efeitos, tanto sobre os microrganismos deterioradores, quanto sobre os desejáveis no produto (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

No caso do gênero *Lactobacillus* spp., estudos apontam que o mesmo reage positivamente à injeção de CO₂ ao leite pois é conhecida a capacidade de formação de CO₂ pelo *Streptococcus thermophilus* estimulando o *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (DRIESSEN; KINGMA; STADHOUDERS, 1982; TINSON et al., 1982). Por outro lado, o *Streptococcus thermophilus* tem a habilidade de utilizar altas concentrações de O₂, e o nível de oxigênio dissolvido em leite fermentado pode ser reduzido e, conseqüentemente a viabilidade de bactérias anaeróbias restritas, como o gênero *Bifidobacterium* spp., aumenta (ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993).

A carbonatação de leite pasteurizado foi avaliada como um método de aumento da viabilidade de bactérias lácticas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e/ou *Bifidobacterium bifidum*) adicionadas ao processo de fermentação. Nos produtos com os dois grupos *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus acidophilus/Bifidobacterium bifidum*, o tempo de fermentação suficiente para atingir o pH 5 foi significativamente menor quando CO₂ ou ácido láctico foi adicionado ao leite. Os maiores níveis de acidez nas amostras carbonatadas (como resultado da produção de ácido carbônico), a adição de ácido láctico e a atividade

metabólica das culturas starters durante a fermentação foram as razões apontadas para a redução do tempo de incubação. Células viáveis de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* gradualmente decresceram a partir do armazenamento refrigerado de leites fermentados não acidificados e carbonatados, embora as contagens sempre permanecessem maiores do que 10^6 UFC/g. O CO_2 não exerceu nenhuma influência na viabilidade do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* em leite fermentados estocados a 4°C , mas a presença de *Bifidobacterium bifidum* e CO_2 no grupo *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus acidophilus/Bifidobacterium bifidum* esteve associada com menor viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante a estocagem refrigerada (VINDEROLA et al., 2000).

Carbonatação, sabor, tipo de cultura láctica, pH e tempo de estocagem foram estudados para investigar o efeito destas variáveis na interação de culturas de iogurte típicas e atípicas e na contaminação bacteriana. Culturas de *Lactobacillus acidophilus* (LA-K) e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 foram adicionadas como culturas atípicas às culturas de iogurte. Após a fermentação, foram inoculadas as bactérias contaminantes *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Listeria monocytogenes* Scott A e, posteriormente, houve a incorporação do gás CO_2 dissolvido em água (1,10 a 1,27 volumes) em algumas amostras de iogurte, seguido do armazenamento a 4°C por 90 dias. O CO_2 não afetou o crescimento das culturas lácticas típicas e atípicas nos iogurte e não inibiu o crescimento das bactérias indesejáveis. Em geral, baixos níveis de CO_2 não afetaram a população bacteriana no iogurte. As razões apontadas pelos autores para a ineficiência do CO_2 foram que o efeito do gás é mais seletivo em bactérias Gram-negativas e que as proporções adotadas do gás foram muito baixas para exercer uma ação inibitória ou estimuladora do crescimento bacteriano em iogurte. Entretanto, a microbiota

do iogurte foi afetada pelo tipo de cultura, pH, tipo de sabor, tempo de estocagem e suas interações (KARAGÜI-YÜCEER; WILSON; WHITE, 2001).

GUEIMONDE et al. (2003) desenvolveram iogurtes a partir de leite pasteurizado previamente submetido a carbonatação até pH de 6,15, sendo comparados com formulações de iogurtes a partir de leite pasteurizado sem tratamento com CO₂. Houve um ligeiro estímulo do gênero *Lactobacillus* spp. durante a fermentação e um aumento de sua viabilidade durante a estocagem refrigerada do iogurte processado a partir do leite tratado com CO₂.

NORIEGA et al. (2003) avaliaram efeito da carbonatação de leite desnatado pasteurizado como um método de inibição do crescimento de *Bacillus cereus* durante a incubação a 37°C e posterior estocagem a 4°C do leite fermentado com *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702. A população de *Bifidobacterium infantis* não foi afetada pela presença de CO₂ e de *Bacillus cereus*. O contaminante multiplicou-se ativamente durante incubação a 37°C, embora tenha reduzido dois ciclos logarítmicos em 12 horas de incubação nas amostras carbonatadas (5,80±0,57 log UFC/mL) em comparação com as amostras não carbonatadas (7,37±0,01 log UFC/mL). Durante a estocagem refrigerada dos leites, as contagens de *Bacillus cereus* progressivamente decresceram e o microrganismo não foi detectado no 14º dia nas amostras carbonatadas, enquanto que nas amostras não carbonatadas o microrganismo ainda se manteve viável até o término da estocagem (35 dias). Na temperatura de 4°C, o CO₂ preveniu a degradação proteolítica de amostras contaminadas e não apresentou efeitos prejudiciais na análise sensorial. Não houve diferenças entre os valores de pH e acidez entre as amostras carbonatadas contaminadas e não contaminadas, que pode ser atribuído a inibição da atividade metabólica do *Bacillus cereus* pelo CO₂. Por outro lado, os menores valores de pH e acidez das amostras carbonatadas em relação à amostra controle (não carbonatada e não contaminada) pode

provavelmente estar relacionada com um efeito estimulatório exercido pelo CO₂ na atividade metabólica do *Bifidobacterium infantis*.

2.4 Efeitos sensoriais da carbonatação

A carbonatação de leites cru e esterilizado foi estudada para determinar modificações nas propriedades sensoriais. O CO₂ foi utilizado para reduzir o pH inicial de amostras de leite de 6,7 para 6,0 ou 6,2 antes do tratamento térmico. Avaliações sensoriais do leite descarbonatado e pasteurizado resultaram em não diferenças entre as amostras controle e tratadas. Amostras que não foram descarbonatadas apresentaram médias significativamente inferiores em relação ao controle devido a sensações táteis associadas a altos níveis de CO₂ dissolvidos (AMIGO; OLANO; CALVO, 1995).

A adição direta de CO₂ ao leite pasteurizado para extensão de sua vida útil não tem sido muito explorada provavelmente devido à hipótese de que o CO₂ pode diminuir a qualidade sensorial do leite (KING; MABBIT, 1982). Entretanto, foi observado que adição de CO₂ em níveis variando de 1,81 a 3,18 mM em leite pasteurizado não apresentaram diferenças sensoriais em relação ao controle até 14 dias de estocagem refrigerada a 6°C e após 14 dias, as médias sensoriais apresentadas pelas amostras de leite pasteurizado carbonatado foram superiores (DUTHIE; SHIPE; HOTCHKISS, 1985).

Não houve diferenças sensoriais significativas entre iogurtes processados após a pasteurização de leite, a partir de leite cru tratado com CO₂ (redução de pH até 6,15) e leite não tratado. Foi constatado que a acidificação de leite cru refrigerado pode ser perfeitamente realizada no processamento de iogurtes (GUEIMONDE et al., 2003).

Iogurte de morango carbonatado com 0,5 kg/cm² de CO₂ a 4°C foi desenvolvido, sendo observado que o CO₂ retardou a formação de ácido e a bebida manteve-se com excelente qualidade por quatro meses a 4,4°C. A amostra controle tornou-se inaceitável

com 30 dias de estocagem refrigerada. No teste sensorial, 89,8% dos julgadores gostaram e 5,1% não gostaram do iogurte carbonatado (CHOI; KOSIKOWSKI, 1985).

YAU; McDANIEL; BODYFELT (1989) avaliaram o efeito sensorial da carbonatação em leite com adição de suco concentrado de frutas vermelhas realizado por julgadores treinados e não treinados. A carbonatação, variando de 1,73 a 1,77 volumes de CO₂ (0 °C, 1 atm), foi positiva nas médias atribuídas à intensidade de doçura e flavor de acordo com julgadores treinados. Os mesmos julgadores comentaram que as bebidas carbonatadas apresentavam características não refrescantes e textura incomum, em contraste com os resultados de CHOI e KOSIKOWSKI (1985), cujos julgadores consideraram iogurtes carbonatados como refrescantes. Aproximadamente 50% de julgadores não treinados gostaram das bebidas carbonatadas e avaliaram como quase ótimo o nível de carbonatação adotado. Observou-se que todos os julgadores participantes nunca avaliaram bebidas carbonatadas a base de leite e por isso reações negativas eram esperadas. Diante deste fato, aconselharam que em trabalhos futuros a triagem dos julgadores deve ter como critério a aceitação do conceito “leite carbonatado”.

Leites saborizados com frutas vermelhas, morango, pêssego e extrato de raízes foram carbonatados com diferentes níveis de carbonatação (volumes < 0,6, 0,74 e 1,42). Foi montado um painel sensorial com julgadores treinados para medir o efeito da carbonatação na percepção do aroma e sabor. Os julgadores detectaram diferenças entre a intensidade de carbonatação, comparando o maior volume de carbonatação com os demais níveis. Carbonatação suprimiu o aroma e sabor de cozido do leite com níveis baixos e intermediários de carbonatação, mas houve um aumento de acidez, efervescência, amargor e adstringência no leite com maior nível de carbonatação (LEDERER; BODYFELT; McDANIEL, 1991).

Um painel sensorial formado por consumidores que não gostavam de iogurte e de refrigerantes reportaram uma preferência (77,2%) por iogurte carbonatados através de uma escala hedônica, que representou uma possibilidade de atratividade para pessoas que normalmente não apreciam o iogurte tradicional. Um dos motivos da preferência foi o sabor refrescante (OGDEN, 1997)

Foram elaborados iogurtes de baixas calorias sabores limão e morango com adição das culturas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* com incubação a 43°C até pH de 5,0 ou 4,2. O gás CO₂ (0,08 a 0,09 kg/cm²) foi incorporado em seguida e o iogurte foi armazenado a 4°C para a avaliação sensorial por julgadores treinados em 7, 21 e 45 dias, enquanto consumidores testaram os iogurtes carbonatados e não carbonatados no 21º dia. A carbonatação não apresentou efeito significativo na aceitabilidade do iogurte durante sua vida útil. Também, o CO₂ não alterou as características sensoriais do iogurte, nem pelos julgadores treinados, nem pelos consumidores. Os autores recomendaram que aperfeiçoamento nos procedimentos de carbonatação e embalagem podem melhorar o sabor e textura do produto (KARAGÜL-YÜCEER et al., 1999).

WRIGHT; OGDEN; EGGETT (2003) determinaram que o limiar sensorial da carbonatação de iogurtes foi em média de 5,97 mM. Recomendaram que este valor de referência pode ser utilizado no desenvolvimento de iogurtes para extensão da vida útil sem mudanças nas propriedades sensoriais.

Uma amostra de leite carbonatado, a partir da injeção de CO₂ ao leite pasteurizado até pH de 6,3, foi submetida a fermentação com *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus acidophilus/Bifidobacterium bifidum* e o produto leite fermentado resultante foi avaliado sensorialmente, após 24 dias de estocagem refrigerada, em relação aos atributos aroma, textura, sabor, acidez e impressão global por 20 julgadores treinados. Os julgadores não detectaram diferenças entre os leites fermentados controle e produzido a partir de leite

carbonatado, indicando que o uso do CO₂ não possui efeitos negativos nas características sensoriais do leite fermentado. Em geral, as notas atribuídas aos atributos textura, sabor e acidez foram ligeiramente superiores nas amostras carbonatadas (VINDEROLA et al., 2000).

No sentido de elucidar se a presença de CO₂ e de diferentes relações de ácido acético/ácido láctico poderiam modificar as propriedades sensoriais de leite com adição de *Bifidobacterium infantis*, avaliações sensoriais de amostras carbonatadas e não carbonatadas foram realizadas nos tempos 1 e 24 dias de armazenamento refrigerado. Após 24 horas de refrigeração, os julgadores não detectaram diferenças entre as amostras. Porém, no tempo 24 dias, as médias de aceitação foram superiores ($p < 0,05$) para os atributos sabor e acidez para as amostras carbonatadas, indicando que leite carbonatado com adição de *Bifidobacterium infantis* é aceito para consumo (NORIEGA et al., 2003).

Em pesquisa realizada por RAVINDRA et al. (2011), foram elaboradas bebidas a base de leite flavorizadas com dissolução de CO₂ (aplicação em garrafas de vidro de 200 mL nas condições de 50 psi de pressão por 30 segundos), sendo as amostras avaliadas sensorialmente através de testes afetivos, a cada 3-4 dias de estocagem refrigerada até 30 dias. As bebidas carbonatadas apresentaram menores notas de aceitação que a amostra controle para flavor, consistência e aceitabilidade global devido a sua característica de ligeira refrescância (expressa como “apenas detectável”), conforme percepção dos julgadores. Ao longo do armazenamento das bebidas carbonatadas, houve uma diminuição das notas referentes ao atributo flavor, mas não houve mudanças significativas das notas atribuídas à consistência. No 17º dia, a amostra controle desenvolveu um sabor ácido, com formação de coalhada e foi rejeitada sensorialmente pelos julgadores. As amostras carbonatadas atingiram pH inferiores a 6,0 após 24 dias de estocagem, mas permaneceram sensorialmente aceitas até o 30º dia.

Diante dos resultados globais obtidos, foi observado que as notas para consistência não foram influenciadas pela carbonatação e nem pelo período de estocagem, enquanto cor e aparência foram influenciadas pelos dois fatores. As notas para flavor e aceitação global foram influenciadas apenas pelo fator período de estocagem (RAVINDRA et al., 2011).

3 REFERÊNCIAS

AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw milk with CO₂: sensory evaluation of heat-processed milks. **Z. Lebensm. Unders. Forsch.**, v. 200, p. 293-296, 1995.

AWAISHEH, S. S.; HADDADIN, M. S. Y.; ROBINSON, R. K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **Int. Dairy J.**, v. 15, n. 11, p. 1184-1190, 2005.

BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R.; LYNCH, J. M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 369-388, 1991.

BEAULIEU, M.; POULIOT, Y.; POULIOT, M. Thermal aggregation of whey proteins in model solutions as affected by casein/whey protein ratios. **J. Food Sci.**, v. 64, p. 776-780, 1999.

BEVNET. **White Soda.** Dez. 2001. Disponível em: <<http://www.bevnet.com/reviews/whitesoda/>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

BLICKSTAD, E.; ENFORS, S. O.; MOLIN, G. Effect of hyperbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14°C. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 50, p. 493-504, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2005/PUBLICACOES_DOU_DEZEMBRO_2005/DO1_2005_08_24-MAPA_MAPA_0.PDF.htm>. Acesso em: 10 out. 2008.

- CALVO, M. M.; BALCONES, E. Inactivation of microorganisms and changes of proteins during treatment of milk with subcritical carbon dioxide. **Milchwissenschaft**, v. 56, p. 366–369, 2001.
- CALVO, M. M.; DERAFANEL, D. Deposition formation in a heat exchanger during pasteurization of CO₂ acidified milk. **J. Dairy Res.**, v. 62, p. 641–644, 1995.
- CHANG, M. K.; ZHANG, H. Carbonated milk: proteins. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 4, p. 880–882, 1992.
- CHEN, J. H.; HOTCHKISS, J. H.; LAWLESS, H. T. Sensory and microbiological quality of cottage cheese packaged in high-barrier film with added carbon dioxide (abstr.). **J. Dairy Res.**, v. 75, supp. 1, p. 95, 1992.
- CHOI, H. S.; KOSIKOWSKI, F. V. Sweetened plain and flavored carbonated yogurt beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 613-619, 1985.
- CHOU, C. C.; HOU, J. W. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, p. 113-121, 2000.
- CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P. DE; BARRETO, P. L. M.; BENEDE, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-116, jan./mar. 2008.
- DAINTY, R. H. The control and evaluation of spoilage. **J. Food Technol.**, v. 6, p. 209–224, 1971.
- DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **J. Food Prot.**, v. 48, p. 532–537, 1985.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **Int. Dairy J.**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DAVIDSON, P. M.; JUNEJA, V. K. BRANEN, J. K. Antimicrobial agents. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M.; SALMINEM, S. THORNGATE III, J. H. (Edits.) **Food Additives**, NY: Marcel Dekker, 2001. p. 563-620.

DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. **Int. Dairy J.**, v. 15, p. 973-988, 2005.

DONALD, J. R.; JONES, C. L.; MACLEAN, A. R. M. The effect of carbonation on bacteria in beverages. **J. Am. Pub. Health**, v. 14, p. 122–124, 1924.

DRIESSEN, F. M.; KINGMA, F.; STADHOUDERS, J. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 36, p. 134-144, 1982.

DUTHIE, C. M.; SHIPE, W. F.; HOTCHKISS, J. H. Effect of low level carbonation on the keeping quality of processed milk (abstr). **J. Dairy Res.**, v. 68, supp. 1, p. 69, 1985.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 5, p. 249-252, 1997.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **J. Dairy Res.**, v. 53, n. 1, p. 139–177, 1986.

FONDEN, R. HOLGERSSON, S. **Method for cultivating, in milk, organisms having a slow growth capacity and organisms produced by the method and milk products containing such organisms**. European Patent Application EP0154614 A2, 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario: Canada, 2002. 11p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO;
WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba: Argentina, 2001. 34p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2011.

FOODBEV. **A History of carbonated milk drinks.** Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.foodbev.com/gallery/a-history-of-carbonated-milk-drinks>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

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

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.; KLAVER, F. A. M.; GRANDE, H. J. Incorporation of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 49, p.71-95, 1995.

GUANDALINI, S.; PENSABENE, L.; ZIKRI, M. A.; DIAS, J. A.; CASALI, L. G.; HOEKSTRA, H.; KOLACEK, S.; MASSAR, K.; MICETIC-TURK, D.; PAPADOPOULOU, A.; SOUSA, J. S. de; SANDHU, B.; SZAJEWSKA, H.; WEIZMAN, Z. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 30, n. 1, p. 54-60, 2000.

GUARINO, A.; CANANI, R. B.; SPAGNUOLO, M. I.; ALBANO, F.; DI BENEDETTO, L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 25, n. 5, p. 516-519. 1997.

GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; DELGADO, T.; BADA-GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk. **Food Res. Int.**, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2003.

GUEIMONDE, M.; CORZO, N.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Evolution of carbohydrate fraction in carbonated fermented milks as affected by β -galactosidase activity of starter strains. **J. Dairy Res.**, v. 69, p. 125-137, 2002.

GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Reduction of incubation time in carbonated *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus acidophilus* fermented milks as affected by the growth and acidification capacity of the starter strains. **Milchwissenschaft**, v. 59, p. 280–283, 2004.

HOFFMAN, W. Ueber den Einfluss hohen hohlensauredrucks auf Bakterien im Wasser und in der milch. **Arch. Fur. Hygiene**, v. 57, p. 379–83, 1906.

HOIER, E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. **Food Aust.**, v. 44, p. 418-420, 1992.

HOLZAPPEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, v. 82, n. 4, p. 690-695, 1999.

HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H. Microbiological effects of the direct addition of CO₂ to pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, v. 79, suppl. 1, p. 87-92, 1996.

HOTCHKISS, J. H.; LEE, E. Extending shelf life of dairy products with dissolved carbon dioxide. **Eur. Dairy Magazine**, v. 3, p. 16-19, 1996.

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, v. 5, n. 4, p. 158-168, 2006.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **J. Food Technol.**, v. 47, p. 129-134, 1993.

ISOLAURI, E.; ARVOLA, T.; SUTAS, Y.; MOILANEN, E.; SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, p. 1604-1610, 2000.

ISOLAURI, E.; JUNTUNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKKEE, P.; KOIVULA, T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. **Pediatrics**, v. 88, p. 90-97, 1991.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; COGGINS, P. C.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Carbonated yogurt – sensory properties and consumer acceptance. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 1394-1398, 1999.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 543-550, 2001.

KING J. S.; MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. **J. Dairy Res.**, v. 49, n. 3, p. 439–447, 1982.

KLAVER, F. A. M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Neth. Milk Dairy J.**, v.47, p.151-164, 1993.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 1205–1213, 1998.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONNAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KNEIFEL, W.; PACHER, B. An X-glu based agar medium for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt-related milk products. **Int. Dairy J.**, v. 3, p. 277-291, 1993.

LAW, B. A.; MABBITT, L. A. New methods for controlling the spoilage of milk and milk products. In: ROBERTS, T. A.; SKINNER, F.A. (Edit.). **Food microbiology: advances and prospects**. London: Academic Press, p 131–150. 1983.

LEDERER, C. L.; BODYFELT, F. W.; McDANIEL, M. R. The effect of carbonation level on the sensory properties of flavored milk beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 2100-2108, 1991.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiol.**, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

LOSS, C. R; HOTCHKISS, J. H. The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. In: SMIT, G. **Dairy processing: improving quality**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 391-416.

MABBITT, L. A. Preservation of refrigerated milk. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 34, p. 28–31, 1982.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic bacteria in whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **Int. Dairy J.**, v. 15, p. 921-927, 2005.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E. Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 97, p. 985-990, 1996.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, p. 179-85, 1997.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E.; SAXELIN, M.; VESIKARI, T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. **J. Pediatr. Gastroent. Nutr.**, v. 20, p. 333-338., 1995.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GÓMEZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **Int. Dairy J.**, v. 16, n. 7, p. 768-774, 2006.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **J. Dairy Sci.**, v. 86, n. 6, p. 1932-1940, 2003.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. H.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO₂ addition to milk on selected analytical testing methods. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 1959–1968, 2001.

MA, Y.; BARBANO, D. M. Milk pH as a function of CO₂ concentration, temperature, and pressure in a heat exchanger. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 3822–3830, 2003.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 1616–1631, 2003.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 264–274, 2000.

MILKPOINT. **Coca-cola lança leite com gás nos EUA**. Jul. 2009. Disponível em:

<<http://www.milkpoint.com.br/mercado/marketing-do-leite/cocacola-lanca-leite-com-gas-nos-eua-55722n.aspx>>. Acesso em: 11 nov. 2011.

MILKPOINT. **Convergência de "mega-tendência" unirá refrigerantes a lácteos em 2012, diz Rabobank.** Fev. 2012. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/convergencia-de-megatendencia-unira-refrigerantes-a-lacteos-em-2012-diz-rabobank-78011n.aspx>>. Acesso em: 23 mar. 2012.

MISRA, A. K.; KUILA, R. K. Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity. **Lait**, v. 72, n.2, p. 213–220, 1992.

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. **Food Microbiol.**, v. 20, p. 519–526, 2003.

OGDEN, L. V. **Process to produce carbonated semi-solid or solid food and the product thereof.** Brigham Young Univ. Provo, UT, assignee. US Pat. N°. 5, 624,700, 1997.

OLIVEIRA, M. N. de; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

OSTLIE, H. M.; TREIMO, J.; NARVHUS, J. A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. **Int. Dairy J.**, v. 15, n. 10, p. 989-997, 2005.

PERDONE, C.A.; BERNABEU, A. O.; POSTAIRE, E.R.; BOULEY, C.F.; REINERT, P. The effect of supplementation by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhea in children attending day care centers. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 53, p. 179-184, 1999.

PRUCHA, M. J.; BRANNON, J. M.; AMBROSE, A. S. **Does carbon dioxide in carbonated milk and milk products destroy bacteria?** Urbana, Illinois: University of Illinois Agricultural Experiment Station, 1922. n. 256, p. 1–8.

RAJAGOPAL, M.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Low pressure CO₂ storage of raw milk: microbiological effects. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 3130–3138, 2005.

RAOUCHE, S.; DOBENESQUE, M.; BOT, A.; LAGAUE, A.; CUQ, J. L.; MARCHESSEAU, S. Stability of casein micelle subjected to reversible CO₂ acidification: impact of holding time and chilled storage. **Int. Dairy J.**, v. 17, p. 873–880, 2007.

RASHED, M.A.; MEHANNA, N. M.; MEHANNA, A. S. Effect of carbon dioxide on improving the keeping quality of raw milk. **J. Soc. Dairy Technol.**, v. 39, n. 2, p. 62-64, 1986.

RAVINDRA, M. R.; RAO, K. J.; NATH, B. S.; RAM, C. Extended shelf life flavoured dairy drink using dissolved carbon dioxide. **J. Food Sci. Technol.**, 03 ago. 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/m6213634u159uq67/fulltext.pdf> >. Acesso em: 26 nov. 2011.

ROBERTS, R. F.; TORREY, G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **J. Dairy Sci.**, v. 71, n. 1, p. 52-60, 1988.

ROBINSON, R. K.; TAMIME, A. Y.; WSZOLEK, M. Microbiology of fermented milks. In: ROBINSON, R. K. (Ed.) **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. New York: Wiley-Interscience, 2002. p. 367–430.

RUAS-MADIEDO, P, BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; GONZALEZ DE LLANO, D.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 502–508, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A.F.; BADA-GANCEDO, J.C.; REYES-GAVILÁN, C.G. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 4, p. 1552-1555, 1998.

SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I.; PERMAN, J.A.; YOLKEN, R. H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **Lancet**, v. 344, p. 1046-9, 1994.

SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão. **Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.

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

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, v. 61, n. 3, p.91-99, 2003.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K.; MARAKIS, S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. **Food Microbiol.**, v. 13, p. 275-280, 1996.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. M. V.; OLIVEIRA, L. M; GOMES, T. G. **Embalagens com atmosfera modificada**. Campinas: CETEA/ITAL, 1996, 114 p.

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P.; MATTEUZII, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, p. 213-219, 1998.

SHORNIKOVA, A.V.; ISOLAURI, E.; BURKANNOVA, L.; LUKOVNIKOVA, S.; VESIKARI, T. A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus* GG for treatment of acute diarrhoea. **Acta Paediatr.**, v. 86, p. 460-5, 1997.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A. A.; LANGOWSKI, H. C. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. **Int. J. Dairy Technol.**, v. 64, p. 1-17, 2011.

SZAJEWSKA, H.; KOTOWSKA, M.; MRUKOWICZ, J. Z.; ARMANSKA, M.; MIKOLAJCZYK, W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhoea in infants. **J. Pediatr.**, v. 138, n. 3, p. 361-365, 2001.

TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **J. Food Prot.**, v. 43, p. 939–977, 1980.

THONGOUPAKARN, K. Effect of CO₂ addition and to raw milk on pasteurized milk quality. [MS thesis]. Ithaca, N.Y.: Cornell Univ., 2001. 55p.

TINSON, W.; BROOME, M. C.; HILLIER, A. J.; JAGO, G. R. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. II. Production of CO₂ and NH₃ from urea. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 37, p. 14-16, 1982.

TOMASULA, P.M.; BOSWELL, R. T. Measurement of the solubility of carbon dioxide in milk at high pressures. **J. Supercrit. Fluid.**, v. 16, p. 21–26, 1999.

VALLEY G.; RETTGER L, F. The influence of carbon dioxide on bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 14, p. 101–108, 1927.

VAN SLYKE, L. L.; BOSWORTH, A. W. **Effect of treating milk with carbon dioxide gas under gas pressure**. Geneva, N.Y.: New York Agricultural Experiment Station, 1907. p. 371–84 (Bulletin n. 292).

VIANNA, P. C. B. Adição de dióxido de carbono ao leite cru: efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT. 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

VILJOEN, B. C.; LOURENS-HATTINGH, A.; IKALAFENG, B.; PETER, G. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. **Food Res. Int.**, v. 36, p. 193–197, 2003.

VINDEROLA, C. G.; GUEIMONDE, M.; DELGADO, T.; REINHEIMER, J. A.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, v. 10, p. 213-220, 2000.

WOLFE, S. K. Use of CO- and CO₂-enriched atmospheres for meats, fish, and produce. **Food Technol.**, v. 29, n. 3, p. 55–58, 1980.

WRIGHT, A.O.; OGDEN, L. V.; EGGETT, D. L. Determination of carbonation threshold in yogurt. **J. Food Sci.**, v. 68, p. 378–381, 2003.

YAU, N. J. N.; McDANIEL, M. R.; BODYFELT, F. W. Sensory evaluation of sweetened flavored carbonated milk beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 367-377, 1989.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 674-679, out./dez. 2004.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA

PROBIÓTICA CARBONATADA:

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E

MICROBIOLÓGICAS

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram avaliar as alterações físico-químicas e a estabilidade microbiológica de bebidas lácteas submetidas aos processos de fermentação e carbonatação. Foram elaboradas quatro formulações de bebidas lácteas: Controle (BL); Fermentada (BLF); Carbonatada (BLC) e Fermentada Carbonatada (BLFC). Nas amostras submetidas à carbonatação, utilizou-se um carbonatador para injeção do gás dióxido de carbono (CO₂) dissolvido em água potável, resultando em um produto com a proporção de 2: 1 (volume de gás/ volume de bebida láctea) e nas amostras fermentadas, adotou-se o cultivo constituído das bactérias lácticas *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® e *Streptococcus thermophilus*. Para a caracterização das bebidas lácteas, foram realizadas análises físico-químicas (pH, acidez titulável, teor de carbonatação, índice de proteólise, composição química) e análises microbiológicas (bolors e leveduras, coliformes totais e *E. coli*) no tempo zero e a cada sete dias, totalizando 28 dias de estocagem refrigerada. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros glicídeos redutores em lactose e em sacarose, pH e índice de proteólise, com menores valores apresentados pelas amostras fermentadas (BLF e BLFC) em comparação com as amostras BL e BLC. Os teores de acidez foram superiores e estatisticamente significantes também para as amostras fermentadas. As bebidas BLF e BLFC apresentaram ausência de microrganismos contaminantes em todos os tempos considerados. A BL apresentou presença de leveduras, com uma contagem estimada de $3,7 \times 10^1$ UFC/mL e coliformes totais, com contagem de $7,7 \times 10^2$ UFC/mL no tempo 28 dias, sendo os valores para coliformes totais acima do limite estabelecido pela legislação após 21 dias de estocagem refrigerada. Na bebida BLC, houve detecção de leveduras na contagem estimada de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL e coliformes totais com uma contagem de $3,3 \times 10^1$ UFC/mL no tempo 28 dias, sendo ainda considerada própria para o consumo. Conclui-se que houve maior estabilidade físico-química e microbiológica das amostras fermentadas. Os métodos de fermentação e carbonatação contribuíram positivamente para menores índices de proteólise e promoveram ação inibitória do crescimento de microrganismos, refletindo na manutenção da qualidade das bebidas lácteas.

Palavras-chave: Bebidas fermentadas, Carbonatação, Microbiologia, Proteólise.

ABSTRACT

The objectives of this assignment were to assess the physicochemical changes and microbiological stability of dairy beverages which have undergone fermentation and carbonation processes. Four formulas of dairy drink were elaborated: Control (BL); Fermented (BLF); Carbonated (BLC) and Carbonated Fermented (BLFC). In samples submitted to a carbonation process, a carbonator was used for the carbon dioxide (CO₂) gas injection dissolved in drinking water resulting in a product with a ratio of 2:1 (volume of gas/ volume of dairy drink) and a cultivation consisting of lactic bacteria *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® and *Streptococcus thermophilus* was employed in the fermented samples. For the characterization of the dairy beverages, physicochemical analyses were carried out (pH, titratable acidity, carbonation level, proteolysis index, chemical composition) and microbiological tests (yeasts and molds, coliform counts and *E. coli*) at time 0 and every seven days, totaling 28 days of refrigerated storage. There were significant differences (p 0.05) in the glucide reducer of lactose and sucrose parameters, pH and proteolysis index, with lower values presented by the fermented samples (BLF and BLFC) compared with the samples BL and BLC. The acidity levels were higher and also statistically significant for the fermented samples. The BLF and BLFC drinks showed absence of contaminating microorganisms at all times considered. The BL sample had presence of yeasts with an estimated count of 3.7×10^1 CFU/mL and coliform count of CFU/mL 7.7×10^2 in 28 days time, these values being above the limit set by the legislation for total coliform after 21 days of refrigerated storage. In the BLC drink there was detection of yeasts in an estimated count of 1.0×10^1 CFU/mL and coliform count of 3.3×10^1 CFU/mL in 28 days time, still being found fit for consumption. It is concluded that there is greater physicochemical and microbiological stability in the fermented samples. The fermentation and carbonation methods contributed positively to lower indexes of proteolysis and promoted inhibitory action of microorganisms' growth, resulting in maintaining the quality of the dairy beverages.

Keywords: Fermented Beverage, Carbonation, Microbiology, Proteolysis.

Introdução

A deterioração dos componentes do leite provocada por alterações físico-químicas e microbiológicas reduz o seu valor econômico e causa impactos negativos na funcionalidade dos nutrientes e na segurança dos produtos. Os métodos de fermentação e carbonatação visam manter a qualidade e aumentar a vida útil de leite e derivados.

A introdução de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados constitui uma alternativa tecnológica que atende às exigências do consumidor atual, cuja tendência é buscar produtos inovadores, diferenciados na textura, que promovam o bem-estar e tragam benefícios à saúde (ARAÚJO, 2007). É importante para a microbiota residente que os probióticos exerçam efeitos antagônicos às bactérias patogênicas pela produção de substâncias antimicrobianas ou por exclusão competitiva. Embora certos tipos de probióticos possam produzir bacteriocinas, o seu papel na inibição do patógeno *in vivo* é limitada. Contudo, metabólitos de baixo peso molecular (como peróxido de hidrogênio, ácido lático e acético e compostos aromáticos) ou seus metabólitos parecem ser mais importantes para os probióticos exercerem seus efeitos inibitórios contra microrganismos indesejáveis (SAARELA et al., 2000).

Além da fermentação, a técnica de carbonatação do leite é considerada um método efetivo de preservação do leite cru e seus derivados. A adição de CO₂ através de embalagem com atmosfera modificada ou injeção direta é economicamente viável para a extensão da vida útil, sendo uma estratégia usada comercialmente no mundo todo para inúmeros produtos lácteos (SINGH et al., 2011).

Existem pesquisas relacionadas com carbonatação de leites e derivados, em que são confirmados os efeitos benéficos da presença do CO₂, como sua ação bacteriostática, ação acidificante do leite e inibição de reações de proteinases e lipases, contribuindo para minimizar deteriorações, alterações sensoriais e perdas nutricionais do leite. Esta técnica já

foi objeto de estudo em leite (CHANG; ZHANG, 1992; HOTCHKISS; LEE, 1996; RUAS-MADIEDO et al., 1996; HOTCHKISS; CHEN; LAWLESS, 1999; THONGOUPAKARN, 2001; MA; BARBANO, 2003; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003; NORIEGA et al., 2003; RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005; VIANNA, 2011) e produtos lácteos como iogurtes (CHOI; KOSIKOWSKI, 1985; KARAGÜL-YÜCEER et al., 1999) e sorvetes (HOTCHKISS; CHEN, 1996).

VIANNA (2010) comprovou que adição de CO₂ manteve a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru durante seu armazenamento refrigerado, o que afetou positivamente a qualidade físico-química do leite UHT (*Ultra High Temperature*). A melhor qualidade microbiológica obtida através da adição de CO₂ ao leite cru resultou num produto UHT com menor proteólise.

RAVINDRA et al. (2011) investigaram a carbonatação em bebidas flavorizadas com adição de leite e indicaram que a tecnologia tem um efeito significativo no aumento da acidez, redução do pH e diminuição da proteólise das amostras carbonatadas. A carbonatação inibiu o crescimento de microrganismos, especialmente os psicrotróficos, durante a estocagem refrigerada, quase dobrando a vida útil das bebidas, acima de 30 dias nas amostras carbonatadas versus 17 dias para amostra controle. Concluíram que as propriedades antimicrobianas do CO₂ podem ser usadas como um método viável economicamente e que adicionalmente estende a vida útil de bebidas lácteas flavorizadas.

As bebidas contendo soro de queijo são, hoje, uma realidade no mercado brasileiro, sendo processadas de diversas maneiras como UHT (*Ultra High Temperature*), pasteurizadas, fermentadas semelhantes ao iogurte, *soft-drinks*, carbonatadas e em diversos sabores, como morango, chocolate, frutas cítricas, etc., com um mercado consumidor bastante promissor (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma formulação de bebida láctea probiótica e carbonatada e avaliar os efeitos da fermentação e carbonatação em parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Material e Métodos

Material

Os ingredientes utilizados nas formulações de bebidas lácteas foram água potável, açúcar refinado (União), leite em pó desnatado (Itambé), soro de leite em pó (Allibra), xarope de glucose (Cargill), estabilizante pectina (Doce Aroma), gás dióxido de carbono (White Martins), corante artificial vermelho Ponceau 4R (Duas Rodas), aroma idêntico ao natural morango (Duas Rodas) e culturas lácticas *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb-12) e *Streptococcus thermophilus* (Biorich, Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca).

Elaboração das bebidas lácteas

O processamento das bebidas lácteas foi realizado nas instalações do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM) e Indústria de Refrigerantes Golé, sediados em Uberaba, MG. O processamento e as formulações das bebidas foram estabelecidos conforme recomendações da empresa Chr. Hansen.

Foram desenvolvidas quatro diferentes formulações de bebidas lácteas sabor morango, conforme especificado na Tabela 1. As proporções dos ingredientes da formulação das bebidas lácteas, em relação ao produto final foram: açúcar refinado (8%), leite em pó desnatado (3,8%), soro de leite em pó (1,6%), xarope de glucose (0,6%), pectina (0,3%), corante artificial vermelho Ponceau 4R (0,01%) e aromatizante idêntico ao

natural morango (0,05%). Nas bebidas fermentadas, utilizou-se o fermento lácteo na proporção de 0,01%.

TABELA 1 – Relação das diferentes formulações das bebidas lácteas sabor morango.

Amostra	Fermentação	Carbonatação
Bebida Láctea Controle (BL)	ausente	ausente
Bebida Láctea Fermentada (BLF)	presente	ausente
Bebida Láctea Carbonatada (BLC)	ausente	presente
Bebida Láctea Fermentada Carbonatada (BLFC)	presente	presente

O processamento da bebida foi dividido em dois blocos (Figura 1): a) base constituída do leite em pó, soro de leite em pó e xarope de glicose dissolvidos em 30% de água e b) xarope composto de açúcar e pectina dissolvidos em 70% de água. No caso específico das bebidas BLC e BLFC, o xarope continha 30% de água, pois o restante (40%) foi incorporado no processo de carbonatação.

A base e o xarope foram colocados, separadamente, em tanques de inox encamisados providos de agitador, sendo submetidos ao tratamento térmico adotando-se o binômio tempo x temperatura, respectivamente de 85°C por 20 minutos e 90°C por 30 minutos, seguido do resfriamento até 40°C em um banho de gelo. Em seguida, o corante e o aromatizante foram adicionados ao xarope em condições de higiene.

O fermento lácteo foi adicionado à base nas BLF e BLFC com homogeneização manual da mistura por 2 minutos. A base foi mantida em estufa a $42\pm 1^\circ\text{C}$ até atingir o pH de $4,8\pm 0,1$, valor recomendado por THAMER e PENNA (2006), o qual foi atingido em aproximadamente 7 horas.

A base (fermentada ou não) e o xarope foram levados a um homogeneizador (Skymssen) em condições de higiene para mistura, constituindo as bebidas lácteas.

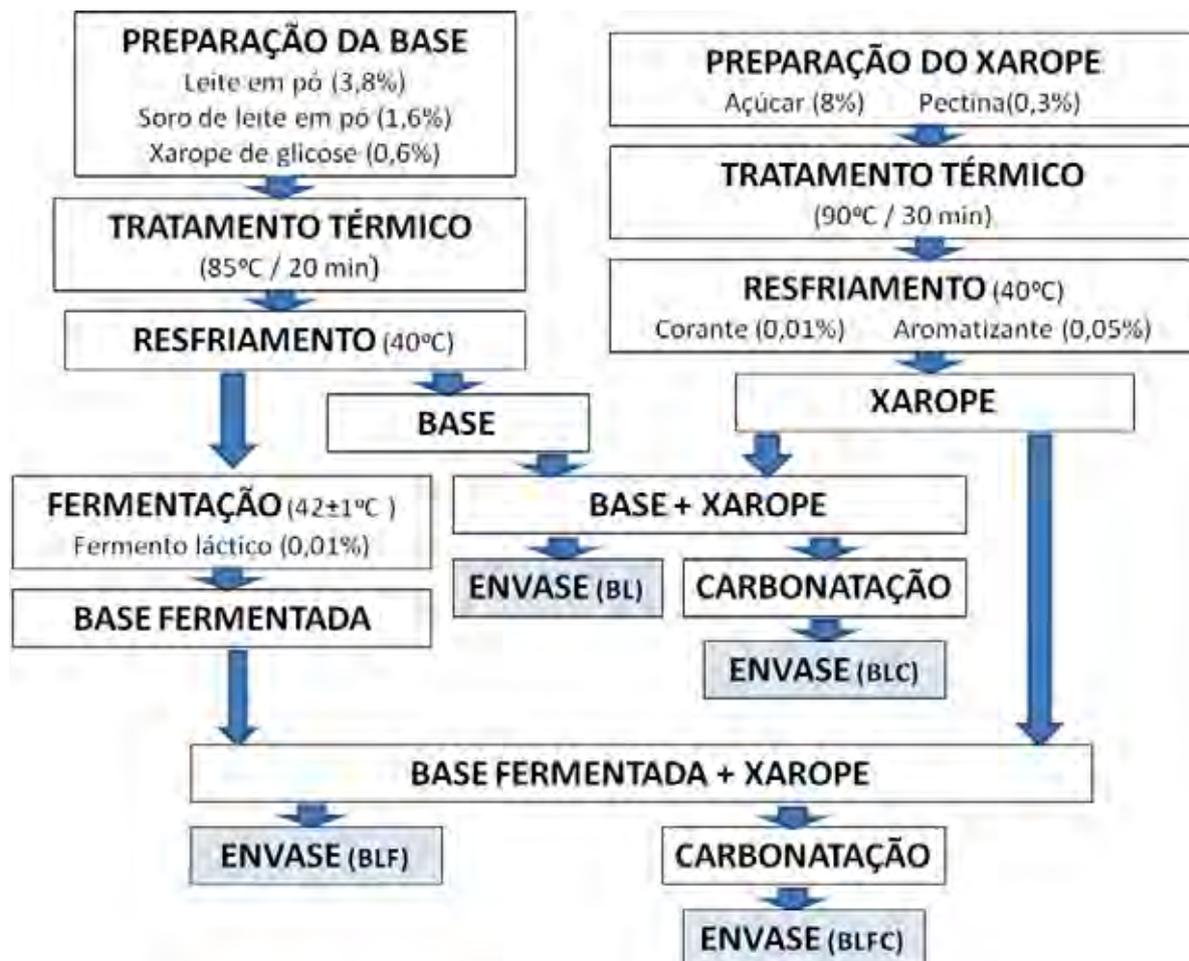


FIGURA 1 – Fluxograma de processamento das bebidas lácteas sabor morango.

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada
BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

As bebidas (BL e BLF) foram envasadas manualmente em garrafas plásticas de polietileno tereftalato (PET) com capacidade 250 mL com tampa de polipropileno (PP), sendo mantidas sob refrigeração a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara fria durante 28 dias de armazenamento.

As bebidas (BLC e BLFC) foram levadas a um tanque post-mix de aço inox, acoplado a um dispositivo de injeção de água potável misturada a gás dióxido de carbono (CO_2) de grau alimentício, sendo o gás mantido em cilindros herméticos em condições de alta pressão (Figura 2). A injeção de gás foi realizada nas condições de $0,5 \text{ kg/cm}^2$ de

pressão e temperatura de 4°C, resultando em uma proporção de 2:1 (v/v), ou seja, dois volumes de CO₂ por volume de bebida láctea. Ato contínuo, as bebidas foram imediatamente envasadas em frascos plásticos de polietileno tereftalato (PET) com capacidade 250 mL com tampa de polipropileno (PP), sendo mantidas sob refrigeração a 5 ±2°C em câmara fria durante 28 dias de armazenamento.



FIGURA 2 – Equipamento de carbonatação das bebidas lácteas sabor morango.

Métodos

As análises microbiológicas e físico-químicas foram conduzidas nos laboratórios do IFTM. O processamento foi efetuado com três repetições e as análises foram realizadas em duplicata.

Análises microbiológicas

As bebidas lácteas foram submetidas às análises microbiológicas de contagens de coliformes totais + *E. coli* (método 991.14) e de bolores e leveduras (método 997.02) conforme AOAC (2005) no tempo zero e a cada sete dias, totalizando 28 dias. Os

resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

Para todas as análises, preparou-se a diluição 10^{-1} , pipetando 1 mL de amostra de bebida láctea para um tubo de ensaio contendo 9 mL do diluente estéril água peptonada 0,1%. Preparou-se a diluição 10^{-2} pipetando 1 mL da diluição 10^{-1} e transferindo para um tubo com 9 mL do diluente estéril e assim até a diluição adotada para cada análise.

Nas contagens de coliformes totais + *E. coli*, alíquotas de 1 mL das diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram plaqueadas na superfície do meio Petrifilm™ E. coli Count Plates (3M Company). Colônias vermelhas e azuis apresentando produção de gás foram contadas como coliformes totais e apenas as colônias azuis com produção de gás como *E. coli* após incubação a $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24-48\pm 2\text{h}$.

Nas contagens de bolores e leveduras alíquotas de 1 mL das diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram plaqueadas na superfície do meio Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (3M Company). Colônias pequenas com as cores rosa escuro e azul esverdeada foram contadas como leveduras e colônias grandes com cores variadas (ex: beje, verde azuladas, marrom, laranja) como bolores após incubação a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco dias.

Análises físico-químicas

Para a caracterização das bebidas lácteas, foram realizadas análises físico-químicas (pH, acidez titulável, teor de carbonatação, índice de proteólise) nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado das amostras. As análises físico-químicas de determinação de carboidratos, umidade, nitrogênio total, nitrogênio não protéico, cinzas e lipídeos foram realizadas no tempo zero, por serem parâmetros não condicionados a grandes variações pelo fator armazenamento.

O pH foi determinado adotando-se o potenciômetro de bancada devidamente calibrado PG-2000 (BRASIL, 2006). A acidez titulável baseou-se no princípio de titulação potenciométrica até ponto de viragem pH equivalente a 8,3, sendo os resultados expresso em porcentagem de ácido lático (BRASIL, 2006). Os carboidratos foram analisados segundo método de Lane-Eynon, sendo obtidos os teores de glicídios redutores em lactose e de glicídios não redutores em sacarose (BRASIL, 2006). A umidade foi realizada pelo método gravimétrico em estufa de circulação forçada de ar nas condições de $102 \pm 2^\circ\text{C}$ por aproximadamente 4 horas (BRASIL, 2006). As cinzas foram obtidas pelo uso da mufla em condições de aquecimento até 550°C por aproximadamente 3 horas (BRASIL, 2006). Os lipídeos foram determinados pelo método de Rose-Gottlieb (INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL, 2005).

O índice de proteólise foi obtido pelo princípio de Kjeldahl através das determinações de nitrogênio total (NT; ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2006) método 991.20; 33.2.11, nitrogênio não protéico (NNP; AOAC, 1995) método 991.20; 33.2.12 e nitrogênio solúvel (NS; AOAC, 1995) método 991.20; 33.2.64. Os resultados de nitrogênio total (NT) foram expressos como equivalente proteína usando o fator de conversão 6,38. O teor real de proteínas foi obtido através de (NT-NNP). A relação entre o nitrogênio solúvel e o teor real de proteínas foi usada como índice de proteólise.

Nas bebidas lácteas carbonatadas (BLC e BLFC), foi monitorado o teor de CO_2 através de um equipamento portátil (Lancer), constituído de um recipiente que foi preenchido por uma alíquota de bebida láctea, sendo feita a leitura da pressão e temperatura do CO_2 . Os resultados destes parâmetros foram correlacionados com o volume do gás dissolvido na bebida, mediante consulta em tabela do fabricante. O teor de CO_2 foi expresso pela relação volume de CO_2 / volume de bebida láctea (v/v).

Planejamento experimental e análise dos resultados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para os resultados físico-químicos (glicídios redutores em sacarose, glicídios redutores em lactose, lipídeos, cinzas, umidade, nitrogênio total, nitrogênio não protéico e proteína). Para nitrogênio solúvel, índice de proteólise, pH e acidez foi adotado um esquema fatorial 4x5 (4 bebidas e 5 tempos) em delineamento inteiramente casualizado e para o teor de CO₂, um esquema fatorial 2x5 (2 bebidas e 5 tempos). Todos os resultados foram submetidos aos testes de normalidade Shapiro Wilk e Bartlett, a fim de verificar se os mesmos apresentavam distribuição normal e se tinham homocedasticidade, respectivamente. Quando estas existiam, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Scott-Knott a 5% de significância ou análise de regressão. Quando estas não existiam, o estudo comparativo das médias dos diferentes tratamentos foi realizado com base nos testes não paramétricos de Friedman a 5% de significância.

Utilizou-se o programa SISVAR v.5.1 (FERREIRA, 2011) para análise de variância, teste de média e análise de regressão e o ASSISTAT v.7.4 (SILVA, 2007) para os testes de normalidade, homocedasticidade e teste não paramétrico.

Resultados e discussão

Parâmetros microbiológicos

As bebidas BLF e BLFC apresentaram ausência de coliformes totais (Coliformes a 35°C), *E. coli*, bolores e leveduras em todas as amostras analisadas e em todos os tempos considerados até 28 dias de estocagem refrigerada das amostras (Tabela 2).

Os resultados apresentados pelas bebidas BLF e BLFC confirmaram o efeito inibitório significativo do crescimento de contaminantes pela ação fermentativa dos cultivos probióticos. Os probióticos são capazes de produzir metabólitos como ácido

acético, ácido láctico e bacteriocinas, exercendo efeito antagônico na população de patógenos e contaminantes nos alimentos (SAARELA et al., 2000).

TABELA 2– Resultados microbiológicos médios das amostras de bebidas lácteas sabor morango no tempo 28 dias de armazenamento refrigerado, expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

Amostras	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	Bolores	Leveduras
BL	$7,7 \times 10^2$	<10	<10	$3,7 \times 10^1$
BLF	<10	<10	<10	<10
BLC	$3,3 \times 10^1$	<10	<10	$1,0 \times 10^1$ *
BLFC	<10	<10	<10	<10
Padrões legais**	$1,0 \times 10^2$ (limite máximo)	-	-	-

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

* valor estimado ** Brasil (2005)

Na BL, não foi constatada presença de bolores e *E. coli* ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado da bebida, porém apresentou presença de leveduras com uma contagem de $3,7 \times 10^1$ UFC/mL e coliformes totais com contagem de $7,7 \times 10^2$ UFC/mL no tempo 28 dias. Na bebida BLC, houve detecção de leveduras na contagem estimada de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL e coliformes totais com uma contagem de $3,3 \times 10^1$ UFC/mL no tempo 28 dias (Tabela 2 e Figuras 3 e 4).

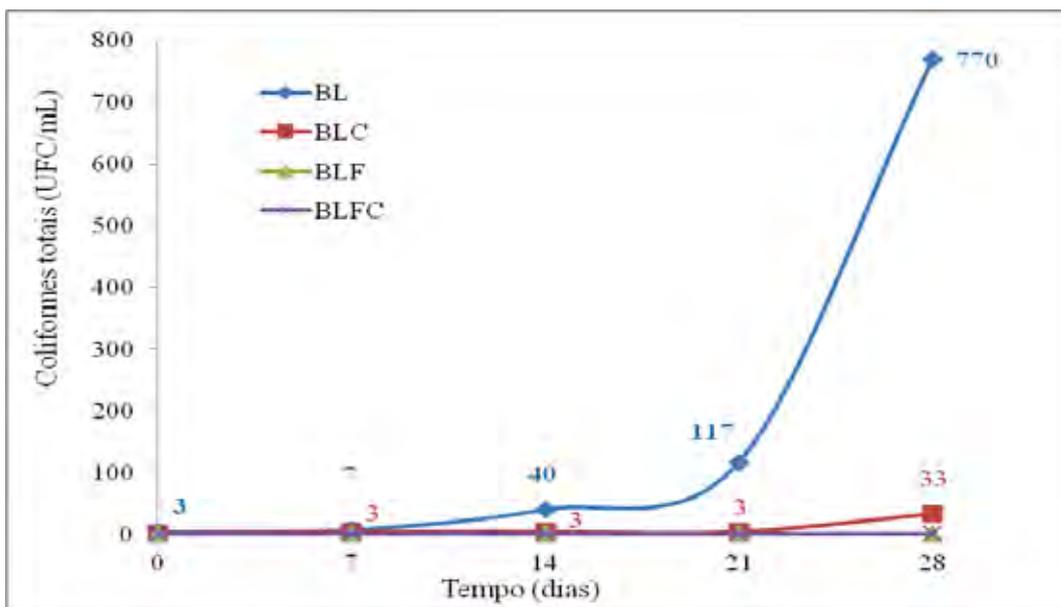


FIGURA 3 – Contagens médias de coliformes totais das amostras de bebidas lácteas sabor morango ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado, expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada

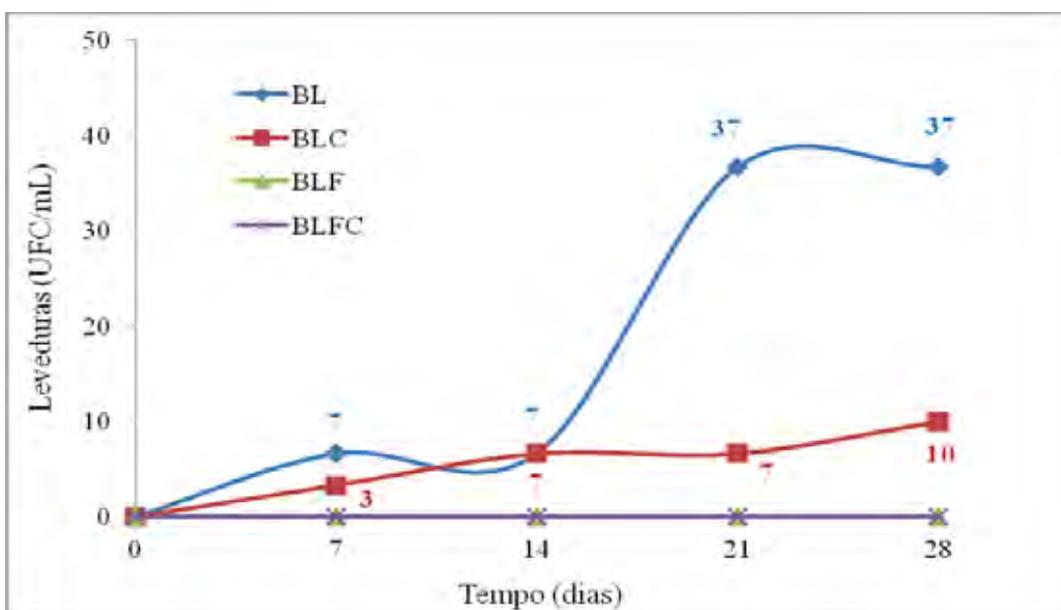


FIGURA 4– Contagens médias de leveduras das amostras de bebidas lácteas sabor morango ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado, expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada

A BL apresentou contagens médias de coliformes totais acima do limite estabelecido para bebida láctea pasteurizada (máximo de 100 UFC/mL) após 21 dias de estocagem refrigerada, o que a classificou como imprópria para o consumo (BRASIL, 2005). Vale ressaltar que não há padrão estabelecido para bolores, leveduras e *E. coli*.

O efeito isolado da carbonatação não promoveu a inibição do crescimento de contaminantes, mas retardou o seu desenvolvimento. Apesar da presença de coliformes totais e leveduras na BLC, os níveis de contagens destes grupos ainda permitiram que a bebida se encontrasse própria para o consumo até 28 dias de armazenamento.

O CO₂ pode exercer efeitos bacteriostáticos ou bactericidas em microrganismos e efeitos estimulatórios em outros microrganismos. Bactérias Gram-negativas, como os coliformes totais, são mais sensíveis ao CO₂ em comparação com bactérias Gram-positivas (LAMBERT; SMITH; DODDS, 1991; KARAGÜI-YUCEER; WILSON; WHITE, 2001). A amostra BL apresentou diferença na contagem de coliformes totais superior a um ciclo logarítmico em comparação com a BLC no tempo 28 dias, confirmando o efeito inibitório do CO₂.

RUAS-MADIEDO et al. (1996) constataram menores contagens de coliformes totais em leite cru tratado reversivelmente com CO₂. A adição de 30 e 45 mM de CO₂ em leite cru refrigerado inibiu coliformes totais (ESPIE; MADDEN, 1997). RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS (2005) chegaram a resultados de redução do crescimento de coliformes totais em leite cru carbonatado, enquanto as contagens no controle aumentaram significativamente.

Vale ressaltar que o efeito inibitório do CO₂ é seletivo e depende de vários fatores como concentração do gás e temperatura da amostra (BLICKSTAD; ENFORS; MOLIN, 1981), características do produto alimentício (OGDEN, 1997) e tipo de microrganismo (DAINTY, 1971; DAVIDSON; JUNEJA, BRANEN, 2001). MARTIN; WERNER;

HOTCHKISS (2003) constataram que o CO₂ diminuiu a taxa de crescimento de populações microbianas em leite cru e leite esterilizado inoculado de bactérias patogênicas e deteriorantes, com maior efeito em Gram-negativos em comparação com Gram-positivos.

TAMIME e DEETH (1980) e CHOI e KOSIKOWSKI (1985) afirmaram que o CO₂ é capaz de inibir o crescimento de bolores e leveduras em iogurtes, porém estes autores levaram em consideração os métodos combinados fermentação e carbonatação. No presente estudo, a carbonatação isoladamente retardou o crescimento de leveduras com menor intensidade em comparação com o efeito sobre os coliformes totais, já que não houve diferenças logarítmicas entre as contagens médias no tempo 28 dias, comparando-se BL e BLC.

Parâmetros físico-químicos

Os resultados físico-químicos obtidos para as formulações avaliadas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de lipídeos, cinzas e umidade (Tabela 3). As formulações BL e BLC não diferiram entre si nos parâmetros glicídeos redutores em lactose e em sacarose, porém apresentaram-se com maiores valores ($p < 0,05$) quando comparados às bebidas BLF e BLFC, sendo que essas duas últimas formulações não se diferiram entre si.

Os teores médios de umidade apresentados pelas bebidas lácteas foram de 85,57%, o que as enquadraram como produtos de limitada vida de prateleira. Por isso, existiu a preocupação em se adotar métodos de conservação, combinados ou não, como o tratamento térmico, fermentação e carbonatação, na tentativa de que os produtos se apresentassem seguros para o consumo até 28 dias de estocagem.

TABELA 3– Resultados médios físico-químicos das amostras de bebidas lácteas sabor morango no tempo zero.

Amostras	Glicídeos redutores em lactose (%)	Glicídeos não redutores em sacarose (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
BL	3,18±0,63 ^a	7,83±0,06 ^a	0,40±0,06 ^a	0,46±0,07 ^a	85,37±0,63 ^a
BLC	3,24±0,18 ^a	7,66±0,28 ^a	0,45±0,02 ^a	0,44±0,05 ^a	85,77±0,40 ^a
BLF	2,18±0,17 ^b	7,41±0,23 ^b	0,49±0,11 ^a	0,42±0,05 ^a	85,63±0,33 ^a
BLFC	2,25±0,20 ^b	7,52±0,28 ^b	0,45±0,03 ^a	0,38±0,05 ^a	85,48±0,66 ^a
CV (%)	12,99	3,04	14,99	12,87	0,59

^{a,b} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); CV = coeficiente de variação

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada

BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

As bebidas lácteas obtiveram teores de lipídeos que as caracterizaram como alimento com reduzido teor de gorduras (BRASIL, 1998), uma vez que a contribuição de lipídeos na formulação veio totalmente do leite em pó desnatado e soro em pó. Em geral, as bebidas lácteas disponíveis no comércio apresentam baixos teores de gordura, sendo necessário padronizar a composição do leite para cumprir as especificações fixadas pelas normas legais.

THAMER e PENNA (2006) ressaltam a importância da porcentagem de gordura no produto final, uma vez que as pessoas estão à procura de uma alimentação mais saudável, incluindo os alimentos *diet* e *light*. Além dos cuidados com a saúde (alimentos funcionais), existem os cuidados e preocupações com a estética corporal.

Os resultados de menores valores de glicídios redutores em lactose eram esperados para as bebidas fermentadas, pois as bactérias lácticas utilizaram parte da lactose como substrato na atividade fermentativa com produção predominante de ácido láctico, o que pode ser comprovado pelos maiores níveis de acidez e menores valores de pH apresentados pelas BLF e BLFC (Tabelas 4 e 5 e Figuras 5 e 7).

GUEIMONDE et al. (2002) constataram a não influência da carbonatação na variação dos teores de lactose, galactose e glicose em leites fermentados adicionados de bactérias probióticas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Bifidobacterium bifidum*) carbonatados e não carbonatados, assim como verificado neste trabalho em que não houve diferenças significativas entre as bebidas lácteas fermentadas com ou sem carbonatação (BLF e BLFC).

De acordo com os valores médios de pH apresentados pelas bebidas ao longo do tempo (Tabela 4), os resultados indicaram que a interação foi significativa para pH, portanto houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as bebidas em todos os tempos analisados.

As BLF e BLFC apresentaram em todos os tempos analisados valores de pH inferiores e significativos em comparação com os valores de pH apresentados pelas BLC e BL. Observou-se que nos tempos 7, 14 e 28 dias, as bebidas BLF e BLFC não diferiram entre si. A BL diferiu de todas, com exceção do tempo 28 dias em relação à BLC, apresentando, em média, maiores valores de pH. Verificou-se que a atividade fermentativa inicial das bactérias lácticas e a carbonatação foram promotores de menores valores de pH apresentados pelas BLF e BLFC.

TABELA 4 – Valores médios de pH de amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

Amostras	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
BL	6,58±0,07 ^a	6,77±0,05 ^a	6,79±0,13 ^a	6,45±0,39 ^a	6,05±0,41 ^a
BLC	5,91±0,04 ^b	6,03±0,06 ^b	6,08±0,05 ^b	6,08±0,02 ^b	6,11±0,07 ^a
BLF	4,75±0,18 ^c	4,61±0,22 ^c	4,55±0,26 ^c	4,80±0,39 ^c	4,57±0,19 ^b
BLFC	4,39±0,04 ^d	4,35±0,01 ^c	4,41±0,02 ^c	4,35±0,03 ^d	4,32±0,02 ^b
CV (%)	3,45				

^{a,b,c} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); CV = coeficiente de variação

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada

BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Em relação ao comportamento do pH versus tempo para cada bebida láctea, os resultados foram significativos ($p < 0,05$) apenas para a BL. O ajuste do modelo quadrático ($R^2 = 0,9876$) apresentado na Figura 5 representou as variações ocorridas do pH de BL em função do tempo.

Houve um aumento gradativo do valor médio de pH da BL até aproximadamente 11 dias, pela possível atividade proteolítica de microrganismos e enzimas endógenas do leite, mas a partir deste tempo houve uma diminuição dos valores de pH, provavelmente pela atividade fermentativa de coliformes totais e leveduras, que apresentaram crescimento significativo a partir de 14 dias de armazenamento refrigerado da bebida (Figuras 3 e 4). Como as bebidas BLC, BLF e BLFC não apresentaram variações de pH significativas ao longo do tempo, pode-se supor que a carbonatação e a fermentação não foram suficientes para alterar os níveis de pH ao longo de 28 dias de armazenamento. HOTCHKISS e LEE

(1996) atestaram que o leite resistia a mudanças de pH por pequenos níveis de carbonatação presentes pela sua capacidade tamponante, pois o CO₂ pode modificar o balanço de sais pela formação de carbonato de cálcio.

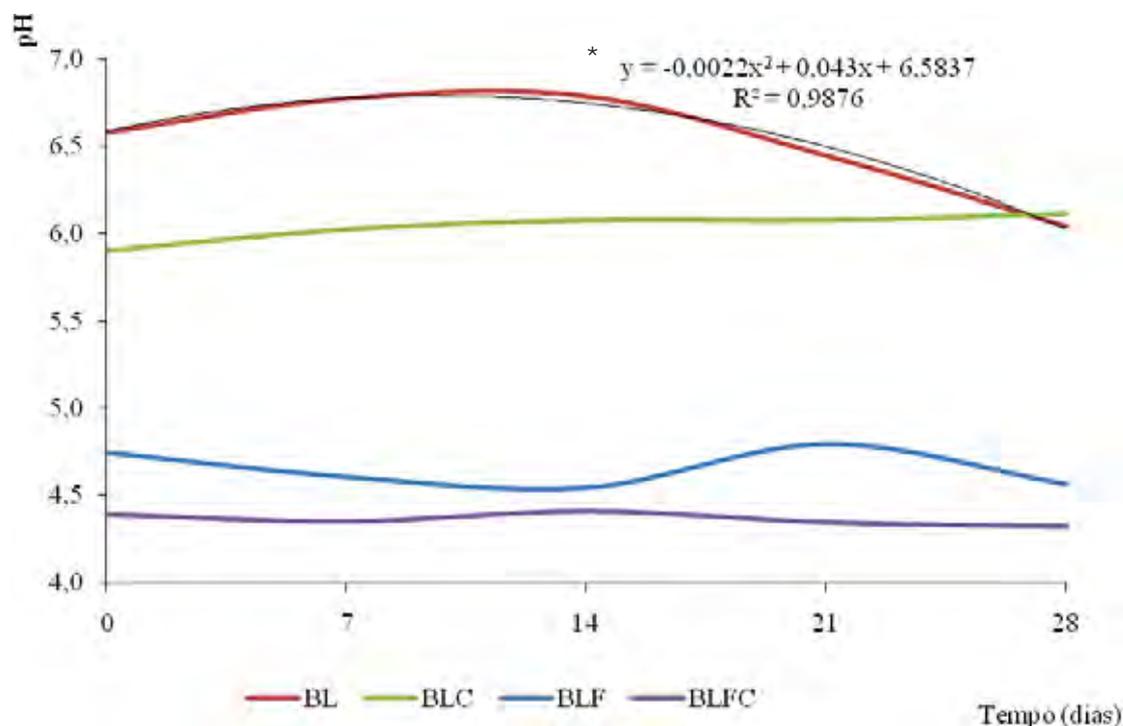


FIGURA 5 – Variações de pH apresentadas pelas amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

*Regressão quadrática do pH da BL em relação ao tempo, com diferença significativa ($p < 0,05$)

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada

BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Foi constatado após o processamento e ao longo de 28 dias, que as BLF e BLFC apresentaram separação de fases dentro do frasco formando uma fase de soro e outra de coalhada. Entretanto, quando se agitava suavemente o frasco, o líquido imediatamente adquiria um estado homogêneo que permanecia por algumas horas. Uma possível explicação para este fenômeno deve-se aos valores médios de pH apresentados pela BLF (4,65) e BLFC (4,37) considerando o tempo de 28 dias de armazenamento refrigerado e,

consequentemente houve o efeito do pH reduzido sobre as proteínas do leite, provocando a coagulação e precipitação das mesmas. YAU; McDANIEL; BODYFELT (1989) também constataram este efeito em bebidas carbonatadas a base de leite e suco concentrado de frutas vermelhas.

THAMER e PENNA (2006) explicam que o controle de pH é importante no processo de fermentação, pois a separação do soro está diretamente relacionada com este parâmetro. Deve-se levar em consideração que a fermentação continua muito lentamente durante o resfriamento, assim, iniciando-se o resfriamento em pH próximo a 4,80, evita-se o abaixamento excessivo. Neste trabalho, o resfriamento das bebidas lácteas (BLF e BLFC) após a fermentação iniciou-se, em média, a partir do pH igual a 4,75. No caso específico da BLFC, houve a adição de CO₂ após a fermentação, resultando no abaixamento adicional do pH. O valor de pH tem sua importância relacionada com o aspecto visual do produto final. É fundamental que haja um controle rigoroso para que não ocorram possíveis separações de fases, acidificação elevada, influenciada pelo tempo de fermentação, além de alterações nas características sensoriais que poderão tornar o produto indesejável (VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000).

Não foi constatado este efeito de precipitação de proteínas do leite na BLC, mesmo com valores inferiores de pH (6,04) e maior acidez em relação a BL, resultado da presença de CO₂. Porém, TOMASULA; BOSWELL (1999) e CALVO; BALCONES (2001) verificaram que a adição de CO₂ ao leite leva à formação de ácido carbônico e decréscimo dos valores de pH resultando em agregação e precipitação de caseínas em valores de pH mais elevados do que o ponto isoelétrico (4,60). CHANG e ZHANG (1992) citam que a concentração de sais e a pressão aplicada na carbonatação contribuem adicionalmente para este fenômeno.

No estudo do teor de carbonatação versus tempo de armazenamento para cada bebida láctea, os resultados indicaram diferença significativa ($p < 0,05$) para BLC e BLFC. Os ajustes do modelo quadrático (R^2), respectivamente, 0,9991 e 0,9918 para BLC e BLFC, representaram variações descendentes nos teores de carbonatação (Figura 6).

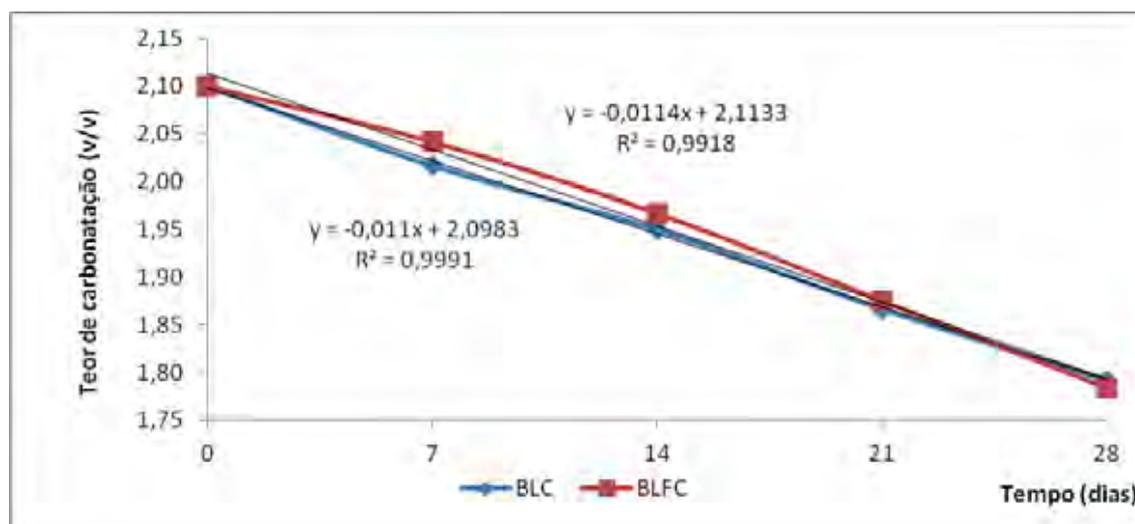


FIGURA 6 – Variações de teor de carbonatação apresentadas pelas amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

*Regressão quadrática do teor de carbonatação das BLF e BLFC em relação ao tempo, com diferença significativa ($p < 0,05$)

BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

O decréscimo gradual do teor de carbonatação das bebidas era esperado ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado. Naturalmente, parte do gás CO_2 tende a migrar do ambiente interno da embalagem para o exterior buscando o equilíbrio de concentração entre os dois ambientes, uma vez que a embalagem plástica PET e o sistema de fechamento da embalagem não constituem em barreiras totais a passagem de gases. Também, ocorre a dissolução parcial de CO_2 na solução aquosa da bebida, transformando o gás em ácido carbônico (RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005; SINGH et al., 2011).

Os teores médios de carbonatação das BLC e BLFC foram equivalentes (média de $1,95 \pm 0,13$ v/v) e não se diferiram entre si, variando de 1,75 a 2,20 ao longo de 28 dias de armazenamento do produto (Figura 6). Os níveis de carbonatação foram inferiores aos utilizados em refrigerantes, em geral (3 a 4 volumes de CO₂ por volume de produto), porém houve a preocupação em balancear as propriedades sensoriais e o efeito microbiológico exercido pelo CO₂. Com estes critérios, escolheu-se um nível de carbonatação próximo ao adotado por YAU; MCDANIEL; BODYFELT (1989) em leite fermentado carbonatado sabor frutas vermelhas, de 1,73 a 1,77 volumes de CO₂, uma vez que os pesquisadores obtiveram resultados sensoriais satisfatórios. Também, preocupou-se em utilizar proporções de gás não muito baixas, diferentemente das adotadas por KARAGÜI-YÜCEER; WILSON; WHITE (2001), que não obtiveram ação inibitória ou estimuladora do crescimento bacteriano em iogurtes carbonatados, com níveis de CO₂ variando de 1,10 a 1,27 volumes.

De acordo com os valores médios de acidez titulável apresentados pelas bebidas ao longo do tempo (Tabela 5), os resultados indicaram que a interação foi significativa ($p < 0,05$).

As bebidas BLC e BLF não diferiram entre si em todos os tempos analisados. A BL diferiu de todas e apresentou médias de acidez inferiores em todos os tempos, enquanto a BLFC também diferiu das demais e seus valores médios de acidez foram superiores em todos os tempos (Tabela 5). Constatou-se, portanto, que a atividade fermentativa das bactérias lácticas e a carbonatação foram promotores da acidez mais elevada das bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

TABELA 5 – Valores médios de acidez titulável (% ácido láctico) de amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

Amostras	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
BL	0,07±0,00 ^c	0,08±0,01 ^c	0,09±0,02 ^c	0,12±0,07 ^c	0,18±0,08 ^c
BLC	0,27±0,02 ^b	0,30±0,03 ^b	0,33±0,01 ^b	0,35±0,03 ^b	0,35±0,05 ^b
BLF	0,33±0,09 ^b	0,35±0,08 ^b	0,37±0,07 ^b	0,36±0,08 ^b	0,38±0,07 ^b
BLFC	0,60±0,02 ^a	0,64±0,01 ^a	0,62±0,04 ^a	0,74±0,02 ^a	0,85±0,02 ^a
CV (%)	13,33				

^{a,b,c} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); CV = coeficiente de variação

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada

BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

No acompanhamento da acidez titulável versus tempo de armazenamento para cada bebida láctea, foi significativo ($p < 0,05$) para BL, BLC e BLFC, ou seja, existe pelo menos uma diferença na acidez titulável em cada bebida durante o armazenamento (Figura 7).

Para a bebida BLF, não houve diferença ao longo do armazenamento refrigerado por até 28 dias, ou seja, a bebida teve o mesmo comportamento de acidez em função o tempo. Os ajustes do modelo quadrático (R^2) foram, respectivamente, 0,9589, 0,9849 e 0,9999 para BLFC, BLC e BL que explicam as variações ocorridas da acidez em função do tempo (Figura 7).

Nas amostras BLC e BLFC, houve um aumento progressivo da acidez ao longo do armazenamento refrigerado, o que também foi constatado por RAVINDRA et al. (2011) no desenvolvimento de uma bebida a base de leite carbonatada. Este efeito pode ter sido causado pela dissolução parcial do CO_2 na solução com formação de ácido carbônico,

refletindo no aumento da acidez das bebidas lácteas ao longo do armazenamento (RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005; SINGH et al., 2011). Como houve crescimento microbiano de coliformes totais e leveduras nas BL e BLC, a atividade fermentativa destes contaminantes pode ter contribuído para a progressão dos índices de acidez ao longo do armazenamento refrigerado das amostras.

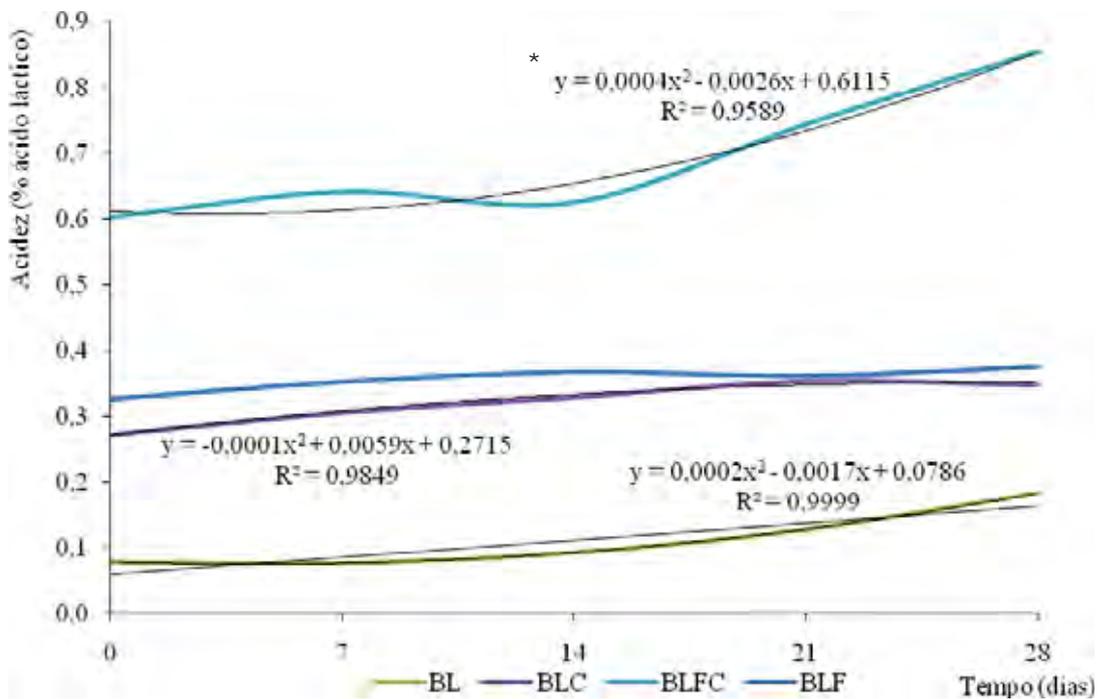


FIGURA 7 – Variações de acidez apresentadas pelas amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

*Regressão quadrática da acidez das BL, BLC e BLFC em relação ao tempo, com diferença significativa ($p < 0,05$)

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada

BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

A BLF apresentou alterações de acidez não significativas, onde a atividade fermentativa de bactérias lácticas se manteve constante ao longo do armazenamento

refrigerado da bebida. Nesta amostra foi constatada a ausência de contaminantes, o que colaborou para a estabilidade dos níveis de acidez da bebida.

As bebidas lácteas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para nitrogênio total e nitrogênio não protéico (Tabela 6). De acordo com os resultados médios obtidos do teor real de proteínas, todas as formulações não diferiram entre si ($p < 0,05$) e atenderam o requisito físico-químico de teor de proteína de origem láctea (mínimo de 1%) relativo a bebidas lácteas fermentadas com adições (BRASIL, 2005).

TABELA 6– Resultados médios físico-químicos das frações protéicas das amostras de bebidas lácteas sabor morango.

Amostras	Nitrogênio total (%)	Nitrogênio não protéico (%)	Proteína (%)
BL	1,55±0,03 ^a	0,19±0,04 ^a	1,36±0,04 ^a
BLC	1,57±0,08 ^a	0,16±0,02 ^a	1,41±0,08 ^a
BLF	1,59±0,11 ^a	0,17±0,04 ^a	1,41±0,09 ^a
BLFC	1,59±0,09 ^a	0,16±0,01 ^a	1,42±0,10 ^a
CV (%)	5,21	15,89	5,73

^{a,b} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); CV = coeficiente de variação

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Os resultados médios de nitrogênio total (1,57%) do presente trabalho foram menores em relação a outros estudos. A proporção de leite em pó e soro de leite em pó adicionada às bebidas nas formulações foi de 5,4%, enquanto outros trabalhos com a mesma base láctea utilizaram formulações com 8% (THAMER; PENNA, 2005; 2006), cujos teores de nitrogênio total variaram de 1,93% a 2,46%.

Os resultados de índice de proteólise (Tabela 7) comparativos entre as bebidas em cada tempo analisado foram significativos e superiores para BL, seguidos dos resultados da BLC com valores intermediários e as BLF e BLFC apresentaram resultados inferiores às demais, sem diferenças significativas entre si. Constatou-se, portanto, que a presença das bactérias lácticas afetou positivamente nos menores índices de proteólise apresentados pelas BLF e BLFC e o CO₂ também exerceu influência, em menor grau, sobre os valores intermediários de índice de proteólise apresentados pela BLC.

TABELA 7 – Valores médios de índice de proteólise apresentados pelas amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

Amostras	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
BL	0,26±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,29±0,02 ^a	0,33±0,04 ^a	0,35±0,08 ^a
BLC	0,19±0,02 ^b	0,21±0,01 ^b	0,22±0,04 ^b	0,23±0,03 ^b	0,25±0,02 ^b
BLF	0,12±0,02 ^c	0,13±0,02 ^c	0,14±0,02 ^c	0,14±0,02 ^c	0,14±0,02 ^c
BLFC	0,12±0,01 ^c	0,14±0,01 ^c	0,14±0,01 ^c	0,14±0,01 ^c	0,14±0,02 ^c
CV (%)	13,84				

^{a,b,c} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); CV = coeficiente de variação

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Quanto ao índice de proteólise versus tempo para cada bebida láctea (Figura 8), o teste de Análise de Variância foi significativo ($p < 0,05$) para as bebidas BL e BLC, ou seja, existem diferenças neste índice entre os tempos de cada bebida. Para as bebidas BLF e BLFC, não houve diferença entre os tempos, ou seja, as bebidas apresentaram o mesmo

comportamento de índice de proteólise em função do tempo. Os ajustes do modelo quadrático (R^2) foram, respectivamente, 0,9472 e 0,9733 para BL e BLC que explicam as variações ocorridas no índice de proteólise em função do tempo.

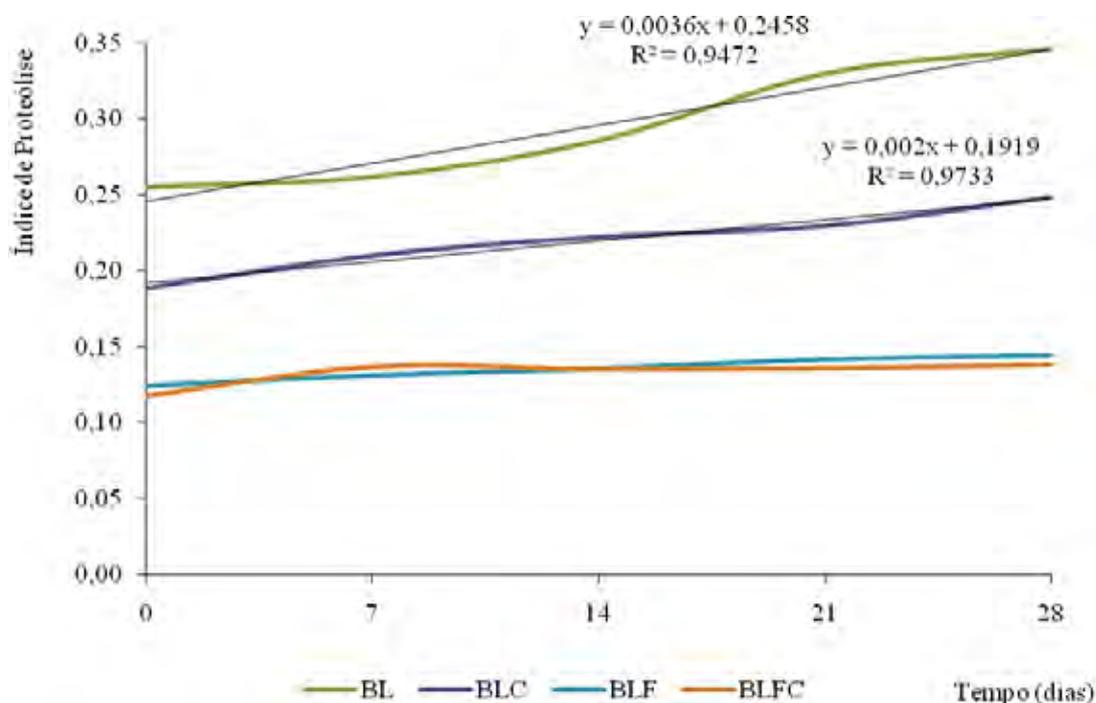


FIGURA 8 – Índice de proteólise apresentado pelas amostras de bebidas lácteas sabor morango, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

*Regressão quadrática do índice de proteólise das BL e BLC em relação ao tempo, com diferença significativa ($p < 0,05$)

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

A proteólise foi superior na amostra controle (BL) e seu índice aumentou ao longo do armazenamento. A enzima endógena no leite, plasmina, é uma protease alcalina presente no leite, sendo sua atividade favorecida em pH mais elevados como apresentados pela bebida BL, cujos valores variaram de 6,05 a 6,79, ao longo de 28 dias de armazenamento. MA; BARBANO; SANTOS (2003), NORIEGA et al. (2003) e VIANNA

(2010) atestaram que maiores taxas de proteólise também estavam correlacionadas com maiores contagens microbianas. A amostra BL apresentou maiores níveis de contaminação para deteriorantes em comparação com outras amostras (Tabela 2). Portanto, por todos estes fatores, maiores índices de proteólise eram esperados para BL.

No caso das bebidas BLF e BLFC, os valores do índice de proteólise estiveram correlacionados com a ação das enzimas endógenas do leite, uma vez que contaminantes apresentaram-se ausentes nas bebidas ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado. As atividades das enzimas proteolíticas foram limitadas pelos baixos valores de pH das amostras resultantes da ação fermentativa das bactérias lácticas e da presença de CO₂ e por isso não houve variações significativas ao longo do armazenamento. Vale salientar que as bactérias probióticas não apresentam atividade proteolítica (KLAVER; KINGMA; WEERKAMP, 1993).

CHOI e KOSIKOWSKI (1985) avaliaram o índice de proteólise em iogurtes carbonatados com 0,5 kg/cm² de CO₂ e não carbonatados. Os teores na bebida carbonatada aumentaram relativamente pouco nos 30 dias de estocagem refrigerada, enquanto os teores aumentaram marcadamente nas bebidas não carbonatadas após 10 dias de estocagem. No presente estudo, não houve diferenças significativas entre as bebidas BLF e BLFC.

A incorporação de CO₂ (14,8 a 22,7 mM) ao leite cru com posterior decarbonatação e pasteurização resultou em um decréscimo de proteólise nas amostras de leite pasteurizado provenientes de leite cru submetido a tratamento com CO₂ (THONGOUPAKARN, 2001). MA; BARBANO; SANTOS (2003) chegaram a resultados que indicaram menores índices de proteólise em leite carbonatado (1500 ppm de CO₂) quando comparados ao controle. O mesmo comportamento foi seguido pelas amostras BL e BLC, que apresentaram diferenças significativas em relação aos índices de proteólise.

Assim como neste trabalho, RAVINDRA et al. (2011) encontraram menores índices de proteólise em bebida a base de leite carbonatada quando comparada ao controle, com diferenças significativas após 10 dias de estocagem refrigerada. Eles explicaram que estes resultados foram influenciados pela inibição do crescimento de microrganismos com a ação do CO₂.

Conclusões

Houve maior estabilidade físico-química e microbiológica das amostras fermentadas BLF e BLFC devido às suas características de apresentarem menores valores de pH, maiores índices de acidez e ausência de contaminantes.

A fermentação e a carbonatação apresentaram efeitos positivos pelos menores valores de índices de proteólise apresentados pelas amostras BLF e BLFC. Valores superiores de índice de proteólise foram encontrados na bebida controle (BL), provocados pelos maiores valores de pH e contagens microbiológicas da amostra.

A fermentação e a carbonatação são métodos eficazes e que podem ser adotados visando o aumento da vida útil de bebidas lácteas.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** jul. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 23 mar. 2012.

ARAÚJO, E. A. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina. 2007. 54 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Gaithersburg: AOAC, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Gaithersburg: AOAC, 2006.

BLICKSTAD, E.; ENFORS, S. O.; MOLIN, G. Effect of hyperbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14°C. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 50, p. 493–504, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2005/PUBLICACOES_DOU_DEZEMBRO_2005/DO1_2005_08_24-MAPA_MAPA_0.PDF.htm>. Acesso em: 10 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 21 abr. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS nº 27, de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jan. 1998.

- CALVO, M. M.; BALCONES, E. Inactivation of microorganisms and changes of proteins during treatment of milk with subcritical carbon dioxide. **Milchwissenschaft**, v. 56, p. 366–369, 2001.
- CHANG, M. K.; ZHANG, H. Carbonated milk: proteins. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 4, p. 880–882, 1992.
- CHOI, H. S.; KOSIKOWSKI, F. V. Sweetened plain and flavored carbonated yogurt beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 613–619, 1985.
- DAINTY, R. H. The control and evaluation of spoilage. **J. Food Technol.**, v. 6, p. 209–224, 1971.
- DAVIDSON, P. M.; JUNEJA, V. K. BRANEN, J. K. Antimicrobial agents. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M.; SALMINEM, S. THORNGATE III, J. H. (Edits.) **Food Additives**, NY: Marcel Dekker, 2001. p. 563–620.
- ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 5, p. 249–252, 1997.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados**. Versão 5.1. Lavras: DEX/UFLA, 2011.
- GUEIMONDE, M.; CORZO, N.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Evolution of carbohydrate fraction in carbonated fermented milks as affected by β -galactosidase activity of starter strains. **J. Dairy Res.**, v. 69, p. 125–137, 2002.
- HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, v. 82, n. 4, p. 690–695, 1999.
- HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H. Microbiological effects of the direct addition of CO₂ to pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, v. 79, suppl. 1, p. 87, 1996.

HOTCHKISS, J. H.; LEE, E. Extending shelf life of dairy products with dissolved carbon dioxide. **Eur. Dairy Magazine**, v. 3, p. 16-19, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2005. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7>. Acesso em: 07 jan. 2009.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; COGGINS, P. C.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Carbonated yogurt – sensory properties and consumer acceptance. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 1394-1398, 1999.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 543-550, 2001.

KLAVER, F. A. M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Neth. Milk Dairy J.**, v.47, p.151-164, 1993.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – A review. **Food Microbiol.**, v. 8, p. 267–297, 1991.

LIMA, S. M. C. G.; MADUREIRA, F. C. P.; PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas: nutritivas e refrescantes. **Milkbizz Tecnol.**, v. 1, n. 3, p. 4-11, 2002.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **J. Dairy Sci.**, v. 86, n. 6, p. 1932-1940, 2003.

MA, Y.; BARBANO, D. M. Milk pH as a function of CO₂ concentration, temperature, and pressure in a heat exchanger. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 3822–3830, 2003.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 1616–1631, 2003.

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. **Food Microbiol.**, v. 20, p. 519–526, 2003.

OGDEN, L. V. **Process to produce carbonated semi-solid or solid food and the product thereof.** Brigham Young Univ. Provo, UT, assignee. US Pat. N^o. 5, 624,700, 1997.

RAJAGOPAL, M.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Low pressure CO₂ storage of raw milk: microbiological effects. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 3130–3138, 2005.

RAVINDRA, M. R.; RAO, K. J.; NATH, B. S.; RAM, C. Extended shelf life flavoured dairy drink using dissolved carbon dioxide. **J. Food Sci. Technol.**, 03 ago. 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/m6213634u159uq67/fulltext.pdf> >. Acesso em: 26 nov. 2011.

RUAS-MADIEDO, P, BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; GONZALEZ DE LLANO, D.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 502–508, 1996.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MALTTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, v. 84, p. 197–215, 2000.

SILVA, F. A. S. e. **ASSISTAT**: Assistência Estatística Versão 7.4 Beta. 2007. Disponível em: <<http://downloads.aonde.com/download/11229/assistat---assistencia-estatistica.htm>>. Acesso em: 10 set. 2011.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A. A.; LANGOWSKI, H. C. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. **Int. J. Dairy Technol.**, v. 64, p. 1-17, 2011.

- TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **J. Food Prot.**, v. 43, p. 939–977, 1980.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Rev. Bras. de Ciênc. Farm.**, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.
- THONGOUPAKARN, K. Effect of CO₂ addition and to raw milk on pasteurized milk quality. [MS thesis]. Ithaca, N.Y.: Cornell Univ., 2001. 55p.
- TOMASULA, P.M.; BOSWELL, R. T. Measurement of the solubility of carbon dioxide in milk at high pressures. **J. Supercrit. Fluid.**, v. 16, p. 21–26, 1999.
- VIANNA, P. C. B. Adição de dióxido de carbono ao leite cru: efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT. 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- VINDEROLA, C. G., BAILO, N., REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Res. Int.**, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.
- YAU, N. J. N.; McDANIEL, M. R.; BODYFELT, F. W. Sensory evaluation of sweetened flavored carbonated milk beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 367-377, 1989.

CAPÍTULO 3

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM BEBIDA LÁCTEA CARBONATADA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida láctea carbonatada e determinar a viabilidade das bactérias lácticas no produto nos tempos 0 e 28 dias de armazenamento refrigerado das amostras. Foram elaboradas as formulações Bebida Láctea Fermentada (BLF) e Bebida Láctea Fermentada Carbonatada (BLFC). Adotou-se o cultivo constituído das bactérias lácticas *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12® e *Streptococcus thermophilus*. Na amostra submetida à carbonatação, utilizou-se um carbonatador para injeção do gás dióxido de carbono (CO₂) dissolvido em água potável. O cultivo *Streptococcus* spp. permaneceu viável ao longo de todo período de armazenamento das amostras com contagens acima de 10⁷ UFC/mL. *Lactobacillus* spp. apresentou contagens acima de 10⁶ UFC/mL apenas para BLFC e *Bifidobacterium* spp., contagens inferiores a 10⁶ UFC/mL nas bebidas em todos os tempos analisados. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da contagem de *Streptococcus* spp. na BLF, diferentemente da BLFC, em que houve redução. As contagens de *Bifidobacterium* spp. mantiveram-se constantes na BLF, enquanto que na BLFC, houve uma redução de quase um ciclo logarítmico. Houve redução da contagem de *Lactobacillus* spp. de aproximadamente um ciclo logarítmico na BLF e uma redução de 0,18 ciclos logarítmicos na BLFC. Conclui-se que a presença do CO₂ não foi estimulatória do crescimento dos gêneros *Streptococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. na BLFC. Em relação ao *Lactobacillus* spp., o CO₂ provocou reduções das contagens na BLFC, mas as reduções foram ainda maiores na BLF. Novos estudos devem ser conduzidos com a tecnologia de carbonatação em bebidas lácteas, com adequação de formulações e dos níveis de CO₂, visando o aumento da viabilidade dos cultivos probióticos.

Palavras-chave: Bactérias probióticas; Bebidas fermentadas; Dióxido de carbono; Microbiologia.

ABSTRACT

The goal of this assignment was to develop a carbonated dairy drink and determine the viability of lactic bacteria in the product stored refrigerated at periods of 0 and 28 days. The Fermented Dairy Beverage (BLF) and Carbonated Fermented Dairy Beverage (BLFC) formulations were elaborated. A cultivation consisting of lactic bacteria *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12® and *Streptococcus thermophilus* was adopted. In the sample submitted to carbonation, a carbonator was used for the carbon dioxide gas (CO₂) injection dissolved in drinking water. The cultivation of *Streptococcus* spp. remained viable throughout the storage period of samples with counts above 10⁷ CFU/mL. *Lactobacillus* spp. presented counts above 10⁶ CFU/mL only for BLFC and *Bifidobacterium* spp., counts less than 10⁶ CFU/mL in the beverages at all times analyzed. There was a significant increase ($p < 0.05$) in the *Streptococcus* spp. counts in BLF, unlike the BLFC in which there was a reduction. The counts of *Bifidobacterium* spp. remained constant in the BLF, while in the BLFC there was a decrease of almost a logarithmic cycle. There was a count reduction of *Lactobacillus* spp. of approximately a logarithmic cycle in the BLF and a reduction of 0,18 logarithmic cycles in the BLFC. It was concluded that the presence of CO₂ was not stimulatory to the growth of the *Streptococcus* spp. genus and the *Bifidobacterium* spp. in the BLFC. In relation to the *Lactobacillus* spp., CO₂ caused reductions of the BLFC counts, but these were higher in the BLF. Further studies should be conducted with the carbonation technology in dairy beverages, with adequacy of formulations and CO₂ levels, increasing the viability of probiotic cultures.

Keywords: Probiotic bacteria; Fermented Beverage; Carbon dioxide; Microbiology.

Introdução

A suplementação de componentes com atividade reconhecidamente benéfica à saúde, como cálcio e vitaminas, constituíam os alimentos funcionais de primeira geração. Nos últimos anos, por outro lado, esse conceito voltou-se principalmente para os probióticos, capazes de exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998).

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 (OLIVEIRA et al., 2002).

O emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados tem sido amplamente estudado devido às dificuldades de manutenção da viabilidade destes microrganismos ao longo da estocagem refrigerada. As bactérias probióticas utilizadas na produção em escala industrial e de processamento devem ser apropriadas para cada tipo de produto e manter-se com boa viabilidade durante o armazenamento. Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos. Fatores como interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem também podem influenciar na sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados. Conseqüentemente, em alimentos fermentados, o pH tende a ser bastante reduzido e o desempenho desses microrganismos é baixo. Por esse motivo, os produtos com menor vida

de prateleira, como o iogurte e leites fermentados, são os mais comumente utilizados como veículos de probióticos (STANTON et al., 2005; GALLINA et al., 2011).

Os efeitos da presença de CO₂ em produtos lácteos podem ser estimulatórios do crescimento de bactérias lácticas, especialmente os probióticos uma vez que as bactérias acido-lácticas parecem ser tolerantes ao CO₂ (ENFORS; MOLIN, 1980; LOUAILECHE et al., 1993). Entretanto, os efeitos do CO₂ na viabilidade de bactérias probióticas ainda não foram totalmente esclarecidos, pois há estudos que comprovaram efeitos benéficos e outros que indicaram que o CO₂ não exerceu influência positiva na viabilidade destes microrganismos.

A carbonatação de leite pasteurizado foi avaliada como um método de aumento da viabilidade de bactérias lácticas probióticas adicionadas ao processo de fermentação. O CO₂ não exerceu nenhuma influência na viabilidade do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* em leite fermentados estocados a 4°C, mas a presença de *Bifidobacterium bifidum* e CO₂ no grupo *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus acidophilus/Bifidobacterium bifidum* esteve associada com menor viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante a estocagem refrigerada (VINDEROLA et al., 2000).

O CO₂ não afetou o crescimento das culturas lácticas típicas e atípicas nos iogurte. As razões apontadas pelos autores para a ineficiência do CO₂ foram que o efeito do gás é mais seletivo em bactérias Gram-negativas (bactérias lácticas são Gram-positivas) e que as proporções adotadas do gás foram muito baixas para exercer uma ação inibitória ou estimuladora do crescimento bacteriano em iogurte (KARAGÜI-YÜCEER; WILSON; WHITE, 2001).

NORIEGA et al. (2003) chegaram a resultados que indicaram que os menores valores de pH e acidez de leites pasteurizados carbonatados em relação à amostra controle estiveram provavelmente relacionados com um efeito estimulatório exercido pelo CO₂ na

atividade metabólica do *Bifidobacterium infantis*. GUEIMONDE et al. (2003) apontaram que houve um efeito estimulatório do gênero *Lactobacillus* spp. durante a fermentação e um aumento de sua viabilidade durante a estocagem refrigerada de iogurte processado a partir do leite tratado com CO₂, quando comparado ao controle.

Com o intuito de oferecer um alimento atrativo e saudável, que funcione como veículo apropriado para o crescimento e sobrevivência de bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb-12) e o cultivo *Streptococcus thermophilus*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da técnica de carbonatação na viabilidade destes cultivos em bebidas lácteas.

Material e Métodos

Material

Os ingredientes utilizados nas formulações de bebidas lácteas foram água potável, açúcar refinado (União), leite em pó desnatado (Itambé), soro de leite em pó (Allibra), xarope de glucose (Cargill), estabilizante pectina (Doce Aroma), gás dióxido de carbono (White Martins), corante artificial vermelho Ponceau 4R (Duas Rodas), aroma idêntico ao natural morango (Duas Rodas) e as culturas lácticas *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb-12) e *Streptococcus thermophilus* (Biorich, Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca).

Elaboração das bebidas lácteas

Foram elaboradas duas formulações de bebidas lácteas sabor morango: Fermentada (BLF) e Fermentada Carbonatada (BLFC). As proporções dos ingredientes da formulação das bebidas lácteas, em relação ao produto final foram: açúcar refinado (8%), leite em pó desnatado (3,8%), soro de leite em pó (1,6%), xarope de glucose (0,6%), pectina (0,3%),

corante artificial vermelho Ponceau 4R (0,01%), aromatizante idêntico ao natural morango (0,05%) e fermento lácteo (0,01%). O processamento e as formulações das bebidas foram estabelecidos conforme recomendações da empresa Chr. Hansen.

O processamento da bebida foi dividido em dois blocos: a) base constituída do leite em pó, soro de leite em pó e xarope de glicose dissolvidos em 30% de água e b) xarope composto de açúcar e pectina dissolvidos em 70% de água. No caso específico da BLFC, o xarope continha 30% de água, pois o restante (40%) foi incorporado no processo de carbonatação.

A base e o xarope foram colocados, separadamente, em tanques de inox encamisados providos de agitador, sendo submetidos ao tratamento térmico adotando-se o binômio tempo x temperatura, respectivamente de 85°C por 20 minutos e 90°C por 30 minutos, seguido do resfriamento até 40°C em um banho de gelo. Em seguida, o corante e o aromatizante foram adicionados ao xarope em condições de higiene. A fermentação foi conduzida para a base em estufa a $42\pm 1^\circ\text{C}$ por aproximadamente 7 horas até a mistura atingir o pH de $4,8\pm 0,1$, valor recomendado por THAMER e PENNA (2006). A base e o xarope foram levados a um homogeneizador (Skymesen) em condições de higiene para mistura, obtendo-se a bebida BLF.

No caso da BLFC, a mistura (base + xarope) foi submetida à carbonatação, utilizando-se um carbonatador para injeção do gás dióxido de carbono (CO_2) dissolvido em água potável, resultando em um produto com a proporção de 2: 1 (volume de gás/ volume de bebida láctea).

As bebidas foram envasadas manualmente em garrafas plásticas de polietileno tereftalato (PET) com capacidade 250 mL com tampa de polipropileno (PP), sendo mantidas sob refrigeração a $5\pm 2^\circ\text{C}$ em câmara fria durante 28 dias de armazenamento.

O processamento das bebidas lácteas foi realizado nas instalações do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM) e Indústria de Refrigerantes Golé, sediados em Uberaba, MG. As análises de contagens de bactérias lácticas foram conduzidas no laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia, MG. O processamento foi efetuado com três repetições e as análises foram realizadas em duplicata.

Métodos

Contagem de bactérias lácticas

As bebidas lácteas foram avaliadas quanto à contagem de células viáveis das bactérias lácticas *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus* spp. e *Streptococcus* spp. nos tempos 0 e 28 dias. Os resultados foram expressos em log₁₀ unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

Para todas as análises, preparou-se a diluição 10^{-1} , pipetando 1 mL de amostra de bebida láctea para um tubo de ensaio contendo 9 mL do diluente estéril água peptonada 0,1%. Preparou-se a diluição 10^{-2} pipetando 1 mL da diluição 10^{-1} e transferindo para um tubo com 9 mL do diluente estéril e assim até a diluição adotada para cada análise.

Na contagem do gênero *Bifidobacterium* spp., utilizou-se o meio de cultura BSM-Agar (Fluka) e suplemento BSM (Fluka 83055) com plaqueamento em profundidade nas diluições de 10^{-2} a 10^{-5} em placas de petri, conforme recomendação do fabricante. Após incubação em estufa sob anaerobiose a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, colônias apresentando cor violeta/marrom foram contabilizadas como células viáveis.

Para a contagem de *Lactobacillus* spp., utilizou-se o meio MRS (Difco) modificado com a acidificação do meio com ácido acético glacial estéril até pH $5,4\pm 0,2$ com plaqueamento em profundidade nas diluições de 10^{-2} a 10^{-5} em placas de petri. Após

incubação em estufa sob anaerobiose a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 ± 3 horas, colônias apresentando cor rósea foram consideradas células viáveis (LOPEZ; MEDINA; JORDANO, 1998).

Na contagem de *Streptococcus* spp., utilizou-se o meio M-17-Agar (Fluka) com adição de solução estéril de lactose 10% conforme metodologia adaptada de LOPEZ; MEDINA; JORDANO (1998). Foi realizado o plaqueamento em superfície nas diluições de 10^{-5} a 10^{-8} em placas de petri. Incubaram-se as placas sob aerobiose em estufa por 24-48 h a $28-30^{\circ}\text{C}$ e após este período, contaram-se as colônias viáveis na cor branca/acinzentada.

Planejamento experimental e análise dos resultados

Para as contagens dos cultivos lácteos utilizou-se um esquema fatorial 2x2 (2 bebidas e 2 tempos). Todos os resultados foram submetidos aos testes de normalidade Shapiro Wilk e Bartlett, a fim de verificar se os mesmos apresentavam distribuição normal e se tinham homocedasticidade, respectivamente. Quando estas existiam, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Scott-Knott a 5% de significância ou análise de regressão. Quando estas não existiam, o estudo comparativo das médias dos diferentes tratamentos foi realizado com base nos testes não paramétricos de Friedman a 5% de significância.

Utilizou-se o programa SISVAR v.5.1 (FERREIRA, 2011) para análise de variância, teste de média e análise de regressão e o ASSISTAT v.7.4 (SILVA, 2007) para os testes de normalidade, homocedasticidade e teste não paramétrico.

Resultados e Discussão

Nas Tabelas 1, 2 e 3, são apresentadas as contagens médias dos cultivos lácticos, respectivamente, *Streptococcus* spp. , *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.

adicionados nas formulações das bebidas lácteas fermentadas (BLF e BLFC) nos tempos 0 e 28 dias.

TABELA 1– Contagem média (n=3) de *Streptococcus* spp. nas bebidas lácteas sabor morango nos tempos zero e 28 dias de armazenamento refrigerado, expressos em log₁₀ unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

Amostras	Tempo (dias)	
	t=0	t=28
BLF	8,38±0,09 ^{aB}	8,54±0,10 ^{aA}
BLFC	8,50±0,11 ^{aA}	7,65±0,10 ^{bB}
CV (%)	1,33	

^{a,b, A,B} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05); CV = coeficiente de variação

BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

No tempo 0, as contagens de *Streptococcus* spp. nas BLF e BLFC não diferiram entre si, enquanto que no tempo 28 dias, apresentaram diferenças significativas (p < 0,05). Analisando o fator tempo, houve um aumento significativo da contagem de *Streptococcus* spp. na BLF comparando-se o tempo 0 e 28 dias, enquanto que na BLFC, houve uma redução da contagem, indicando que o CO₂ exerceu um efeito negativo na viabilidade deste grupo de bactéria láctica na bebida (Tabela 1). As espécies do gênero *Streptococcus* spp. apresentam metabolismo aeróbio e anaeróbio facultativo. SINGH et al. (2011) comentam que a substituição do O₂ pelo CO₂ desfavorece o crescimento de microrganismos aeróbicos, o que pode ser uma explicação para a redução das contagens na BLFC.

Os efeitos da adição de CO₂ foram investigados em duas variantes morfológicas de *Streptococcus thermophilus* CNRZ 368. A variante difusa (012) apresentou crescimento

pela adição de CO₂, enquanto a variante opaca (031) não foi afetada pela adição de CO₂ (LOUAILECHE et al., 1993)

Detectou-se que no tempo 0, as contagens de *Bifidobacterium* spp. das BLF e BLFC diferiram entre si enquanto que no tempo 28 dias, não foi observada diferença (p < 0,05). Analisando o fator tempo, as contagens de *Bifidobacterium* spp. foram constantes na BLF, sem diferenças significativas, comparando-se o tempo 0 e 28 dias, enquanto que na BLFC, houve uma redução da contagem de quase um ciclo logarítmico, indicando que o CO₂ novamente exerceu um efeito negativo na viabilidade deste grupo de bactéria láctica na bebida (Tabela 2).

TABELA 2– Contagem média (n=3) de *Bifidobacterium* spp. nas bebidas lácteas sabor morango nos tempos zero e 28 dias de armazenamento refrigerado, expressos em log10 unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

Amostras	Tempo (dias)	
	t=0	t=28
BLF	4,93±1,00 ^{bA}	5,22±0,12 ^{aA}
BLFC	5,72±0,07 ^{aA}	4,85±0,43 ^{aB}
CV (%)	11,60	

^{a,b, A,B} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05) ; CV = coeficiente de variação
BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Diferentemente deste trabalho, NORIEGA et al. (2003) atestaram diferenças não significativas na população de *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702 em leites carbonatados e não carbonatados ao longo de armazenamento refrigerado por 35 dias.

GOMES e MALCATA (1999) indicaram que há a ausência de crescimento do gênero *Bifidobacterium* spp. a valores de pH ácidos de 4,5-5,0, faixa dentro dos valores médios de pH apresentados pela BLF (4,65) e superiores a BLFC (4,37). Em função da baixa velocidade de multiplicação das culturas probióticas em relação às bactérias lácticas tradicionais, controle da assepsia e adição de fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para se obter altas contagens iniciais de células viáveis de probióticos. Caso contrário, esta população ficaria muito abaixo daquela do fermento. Portanto, explicações razoáveis para a redução da contagem na BLFC são os valores baixos de pH da amostra e ausência de fatores de promotores de crescimento na formulação da bebida.

TABELA 3– Contagem média (n=3) de *Lactobacillus* spp. nas bebidas lácteas sabor morango nos tempos zero e 28 dias de armazenamento refrigerado, expressos em log10 unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de amostra (mL).

Amostras	Tempo (dias)	
	t=0	t=28
BLF	6,61±0,08 ^{aA}	5,62±0,12 ^{aB}
BLFC	6,46±0,13 ^{aA}	6,28±0,15 ^{bB}
CV (%)	2,20	

^{a,b, A,B} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05); CV = coeficiente de variação

BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

No tempo 0, as contagens de *Lactobacillus* spp. das BLF e BLFC não diferiram entre si enquanto que no tempo 28 dias, diferiram entre si. Analisando o fator tempo, houve uma redução da contagem de *Lactobacillus* spp. de aproximadamente um ciclo logarítmico na BLF e uma redução de 0,18 ciclos logarítmicos na BLFC, comparando-se

os tempos 0 e 28 dias. Os resultados indicaram que o CO₂ exerceu um efeito negativo no crescimento deste gênero de bactéria, mas vale destacar que a sua ausência na formulação acarretou em uma redução ainda maior das contagens de *Lactobacillus* spp. (Tabela 3).

O *Lactobacillus* spp. reage positivamente à injeção de CO₂ ao leite pois é conhecida a capacidade de formação de CO₂ pelo *Streptococcus thermophilus* estimulando o *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (DRIESSEN; KINGMA; STADHOUDERS, 1982; TINSON et al., 1982). HENDRICKS e HOTCHKISS (1997) ressaltaram que menores efeitos de inibição do CO₂ são geralmente observados em psicrotóxicos Gram-positivos, especialmente *Lactobacillus* spp. Não houve inibição do gênero *Lactobacillus* spp. pela adição de CO₂ em leite cru refrigerado (ESPIE; MADDEN, 1997) e houve aumento de sua viabilidade durante a estocagem refrigerada do iogurte processado a partir do leite carbonatado (GUEIMONDE et al., 2003). Entretanto, a carbonatação em leite cru esteve relacionada com a redução de *Lactobacillus* spp. (RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005).

ROBERTS e TORREY (1988) observaram que o CO₂ não promoveu o crescimento de microrganismos anaeróbios e anaeróbios facultativos em leite esterilizados. Células viáveis de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* gradualmente decresceram a partir do armazenamento refrigerado de leites fermentados carbonatados em estudos de VINDEROLA et al. (2000). Como no presente trabalho, o CO₂ não exerceu influência positiva na viabilidade dos cultivos lácticos.

VINDEROLA et al. (2000) relataram que a presença de *Bifidobacterium bifidum* e CO₂ junto aos grupos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* esteve associada com menor viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* durante a estocagem refrigerada. Este efeito foi constatado neste trabalho, pois ao longo de 28 dias de estocagem, as contagens do *Lactobacillus* spp. reduziram na BLFC, porém este efeito foi

mais intenso na BLF, pois houve a redução de quase um ciclo logarítmico nas contagens de *Lactobacillus* spp. em relação aos tempos 0 e 28 dias. ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (2004) também constataram que populações de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram redução de um ciclo logarítmico até 21 dias de estocagem em leites fermentados.

GOMES e MALCATA (1999) destacaram, com efeito dos vários estudos de sobrevivência realizados por diversos pesquisadores, que existe um consenso de que produtos com acidez elevada, caso das bebidas lácteas desenvolvidas neste trabalho, conduzem a uma maior perda de viabilidade de bactérias probióticas do que produtos com baixa acidez. VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER (2000) confirmaram que o decréscimo de pH interfere na viabilidade da microflora probiótica, reduzindo as contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. durante a estocagem refrigerada de iogurtes.

Diante dos resultados globais das contagens de cada grupo de bactéria láctica nas bebidas, pode-se afirmar que a presença do CO₂ não foi estimulatória do crescimento dos microrganismos, especialmente nos grupos *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus* spp., e seu efeito foi menos inibitório no caso do *Lactobacillus* spp.

Para a produção de benefícios terapêuticos, é sugerido um mínimo de 10⁵ a 10⁶ UFC/mL (5 a 6 log₁₀UFC/mL) de bactérias probióticas em leites fermentados (SAMONA; ROBINSON, 1994). O gênero *Lactobacillus* spp. apresentou a contagem mínima para ser considerado probiótico em todas as amostras, enquanto o gênero *Bifidobacterium* spp. apresentou contagem mínima apenas no tempo 28 dias para BLF e no tempo 0 para BLFC.

Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (BRASIL, 2005) e Leites Fermentados (BRASIL, 2007) preconizam que a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10⁶ UFC/mL (6 log₁₀UFC/mL). A

legislação específica que no caso em que mencione um ou mais cultivos lácticos específicos, estes também devem atender a estes requisitos. Em relação a esta exigência, o gênero *Streptococcus* spp. enquadrou-se a esta particularidade para as BLF e BLFC e *Lactobacillus* spp. apenas para a BLFC ao longo de todo período de armazenamento. *Bifidobacterium* spp. não conseguiu atingir a contagem mínima necessária em todas as amostras e tempos considerados.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2008), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al. (2006) também especificam que o mínimo exigido de bactérias probióticas seria 10^6 UFC/mL.

As bebidas lácteas deste trabalho não podem ser consideradas probióticas, pois os gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. não atenderam a exigência de contagem mínima. O gênero *Streptococcus* spp., apesar de ter apresentado contagens elevadas variando de 10^7 - 10^8 UFC/mL em todas as amostras, não é mais considerado probiótico. O *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foi retirado da lista de alegações de propriedades funcionais tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado (ANVISA, 2008).

Pode-se afirmar que existiu a predominância de *Streptococcus* spp. sobre os demais cultivos lácticos, assim como em pesquisa de THAMER e PENNA (2005). MISRA e KULIA (1992) comentam que o menor número de células viáveis de bifidobactérias em comparação com outras bactérias lácticas justifica-se pelo seu lento crescimento no período de incubação.

Segundo CUNHA et al. (2008), a manutenção da contagem de células viáveis probióticas pode ter sido influenciada pelo uso da cultura mista associada e suas interações. O emprego de *Streptococcus thermophilus*, segundo LIN et al. (2006), diminui o teor de oxigênio no meio, contribuindo para a estabilidade e manutenção das bifidobactérias, o que foi confirmado neste trabalho apenas para BLF.

Conclusões

Os resultados indicaram que o CO₂ exerceu um efeito negativo na viabilidade dos cultivos lácticos para BLFC, pois houve decréscimo nas contagens dos grupos *Streptococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp., comparando os tempos 0 e 28 dias. No caso particular do gênero *Lactobacillus* spp., o efeito do CO₂ foi menos inibitório, pois as reduções nas contagens da BLF foram superiores quando comparadas a BLFC.

Estudos complementares devem ser conduzidos com a tecnologia de carbonatação em bebidas lácteas, com possíveis ajustes nas formulações de bebidas como a adição de promotores de crescimento de bactérias lácticas e aumento da proporção de fermento lácteo na formulação. Outras opções seriam a utilização de novas cepas de bactérias lácticas e de diferentes níveis de concentração de CO₂, visando o aumento da viabilidade dos cultivos probióticos.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** jul. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 23 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2005/PUBLICACOES_DOU_DEZEMBRO_2005/DO1_2005_08_24-MAPA_MAPA_0.PDF.htm>. Acesso em: 10 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados.** Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18164>>. Acesso em 10 ago. 2008.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P. DE; BARRETO, P. L. M.; BENEDE, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-116, jan./mar. 2008.

DRIESSEN, F. M.; KINGMA, F.; STADHOUDERS, J. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 36, p. 134-144, 1982.

ENFORS, S. O.; MOLIN, G. Effect of high concentrations of carbon dioxide on growth rate of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus cremoris*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 48, n. 3, p. 409-416, 1980.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 5, p. 249-252, 1997.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados.** Versão 5.1. Lavras: DEX/UFLA, 2011.

GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S. e; TRENTO, K. H. de S.; CARUSI, J. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011.

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

GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; DELGADO, T.; BADA-GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk. **Food Res. Int.**, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2003.

HENDRICKS, M. T.; HOTCHKISS, J. H. Effect of CO₂ on *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria monocytogenes* growth in aerobic atmospheres. **J. Food Prot.**, v. 60, p. 1548–1552, 1997.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 543-550, 2001.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiol.**, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

LOPEZ, M.C.; MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Survival of lactic acid bacteria in comercial frozen yogurt. **J. Food Sci.**, v.63, p.706-708, 1998.

LOUAILECHE, H.; BRACQUART, P.; SAULNIER, F.; DESMAZEAUD, M. Carbon dioxide effects on the growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 3683-3689, 1993.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GÓMEZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **Int. Dairy J.**, v. 16, n. 7, p. 768-774, 2006.

MISRA, A. K.; KUILA, R. K. Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity. **Lait**, v. 72, n. 2, p. 213–220, 1992.

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. **Food Microbiol.**, v. 20, p. 519–526, 2003.

OLIVEIRA, M. N. de; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

RAJAGOPAL, M.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Low pressure CO₂ storage of raw milk: microbiological effects. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 3130–3138, 2005.

ROBERTS, R. F.; TORREY, G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **J. Dairy Sci.**, v. 71, n. 1, p. 52-60, 1988.

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

SILVA, F. A. S. e. **ASSISTAT**: Assistência Estatística Versão 7.4 Beta. 2007. Disponível em: <<http://downloads.aonde.com/download/11229/assistat---assistencia-estatistica.htm>>. Acesso em: 10 set. 2011.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A. A.; LANGOWSKI, H. C. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. **Int. J. Dairy Technol.**, v. 64, p. 1-17, 2011.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.16, p.196-203, 2005.

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

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Rev. Bras. de Ciênc. Farm.**, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.

TINSON, W.; BROOME, M. C.; HILLIER, A. J.; JAGO, G. R. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. II. Production of CO₂ and NH₃ from urea. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 37, p. 14-16, 1982.

VINDEROLA, C. G., BAILO, N., REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic in Argentinian yoghurts during refrigerate storage. **Food Res. Int.**, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.

VINDEROLA, C. G.; GUEIMONDE, M.; DELGADO, T.; REINHEIMER, J. A.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, v. 10, p. 213-220, 2000.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 674-679, out./dez. 2004.

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

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA LÁCTEA

PROBIÓTICA CARBONATADA:

CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

RESUMO

O presente trabalho objetivou analisar o efeito da fermentação e carbonatação de bebidas lácteas em relação às características sensoriais. Foram elaboradas quatro formulações de bebidas lácteas: Controle (BL); Fermentada (BLF); Carbonatada (BLC) e Fermentada Carbonatada (BLFC). Nas amostras submetidas à carbonatação, utilizou-se um carbonatador para injeção do gás dióxido de carbono (CO₂) dissolvido em água potável, resultando em um produto com a proporção de 2: 1 (volume de gás/ volume de bebida láctea) e nas amostras fermentadas, adotou-se o cultivo constituído das bactérias lácticas *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® e *Streptococcus thermophilus*. Os testes sensoriais afetivos de aceitação e intenção de compra foram aplicados a 50 julgadores não treinados os quais avaliaram as quatro formulações de bebidas nos tempos 7 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração. Os resultados indicaram que para cor, textura, sabor, acidez e refrescância, o teste de Friedman foi significativo ($p < 0,05$) e para aroma, o teste foi não significativo. No tempo 7 dias, houve uma preferência geral pelas bebidas não carbonatadas, primeiramente BLF, seguida da BL, e no tempo 21 dias, novamente a BLF foi a mais aceita, mas houve uma aceitação superior pela BLC em comparação a BL. Nos resultados de intenção de compra, foram obtidos valores superiores a 70% de intenção positiva para BLF em todos os tempos. Os menores percentuais de intenção de compra foram obtidos pela BL e BLFC, enquanto a bebida BLC apresentou resultados intermediários. Pode-se dizer que o mercado consumidor já está consolidado para bebidas lácteas fermentadas, mas existe potencial de aceitação por bebidas lácteas carbonatadas, que são até então desconhecidas pelo mercado consumidor nacional.

Palavras-chave: Aceitação, Bebidas fermentadas, Carbonatação, Sensorial.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the effects of dairy beverages fermentation and carbonation in relation to sensorial characteristics. Four formulas of dairy drink were elaborated: Control (BL); Fermented (BLF); Carbonated (BLC) and Carbonated Fermented (BLFC). In samples submitted to a carbonation process, a carbonator was used for the carbon dioxide gas (CO₂) injection dissolved in drinking water, resulting in a product with a ratio of 2:1 (volume of gas/ volume of dairy drink) and a cultivation consisting of lactic bacteria *Lactobacillus acidophilus*-LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® and *Streptococcus thermophilus* was employed in the fermented samples. Effective sensory acceptance tests and purchase intention were applied to 50 untrained consumers who evaluated the four formulations of drinks in periods of 7 and 21 days of refrigerated storage. The results indicated that for color, texture, flavor, acidity and freshness, the Friedman's test was significant ($p < 0.05$) and for aroma, the test was not significant. In 7 days time, there was a general preference for the non-carbonated drinks, firstly BLF, followed by BL, and in 21 days time, again the BLF was the most widely accepted, but there was a greater acceptance for BLC as compared to BL. In purchase intent results, positive intention values of over 70 were obtained for BLF at all times. The smallest percentages of purchase intention were obtained by BL and BLFC, while the BLC drink presented intermediate results. It can be said that the consumer market is already consolidated for dairy fermented beverages, but there is also potential for acceptance of carbonated beverages, which are hitherto unknown by the national consumer market.

Keywords: Acceptance, Fermented beverage, Carbonation, Sensorial.

Introdução

As características sensoriais dos produtos alimentícios são relevantes, pois decorrem da interação entre os produtos e o consumidor. O conjunto dos requisitos de segurança, conveniência, nutricional e sensorial constitui a estrutura da qualidade do produto em si. Entretanto, a expectativa do consumidor envolve mais do que a satisfação desses requisitos, devendo ser satisfeitas também as necessidades fundamentais da dieta no momento da escolha do alimento a ser consumido (PERI, 2006).

A busca por produtos saudáveis não é recente, mas houve um aumento no lançamento e divulgação de alimentos funcionais nos últimos anos. Os produtos lácteos fermentados se enquadram como alternativas para o consumidor, devido ao seu alto valor nutritivo, sabor fresco e textura agradável (TEBALDI, 2005). As bactérias lácticas são fatores que garantem a preservação e as características sensoriais de vários produtos, contribuindo para textura, paladar, percepção do gosto e estabilidade de produtos fermentados (SOUZA et al., 2007).

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 (OLIVEIRA et al., 2002).

A carbonatação é incorporada em várias bebidas com o propósito de conferir refrescância, efervescência e aumento da sensação de sabor. Há poucas informações de como a carbonatação afeta a percepção de outros atributos sensoriais como aroma, acidez, cor e textura em leite e derivados. Neste contexto, no sentido de oferecer variedade e competitividade no mercado, as bebidas lácteas carbonatadas podem ser uma opção atrativa para o consumidor.

Os aspectos sensoriais de produtos lácteos carbonatados ou provenientes de leite cru previamente carbonatado já foram avaliados por diversos autores, sendo os resultados positivos (CHOI; KOSIKOWSKI, 1985; DUTHIE; SUIPE; HOTCHKISS, 1985; OGDEN, 1997; NORIEGA et al., 2003; RAVINDRA et al., 2011) ou sem diferenças (AMIGO; OLANO; CALVO, 1995; RUAS-MADIEDO et al., 1996; KARAGÜL-YÜCEER et al., 1999; VINDEROLA et al., 2000; GUEIMONDE et al., 2003).

YAU; MCDANIEL; BODYFELT (1989) observaram que os julgadores ainda não estão familiarizados com o termo “leite carbonatado”. Em geral, a presença do CO₂ proporciona características de refrescância, e sabor mais intenso. LEDERER; BODYFELT; McDANIEL (1991) afirmaram que a carbonatação pode suprimir o aroma e sabor de cozido do leite, mas aumentar a sensação de acidez, efervescência, amargor e adstringência.

Diante do desafio de inserção da técnica carbonatação, comumente aplicada no processamento de água e refrigerantes, como um diferencial em produtos lácteos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitação e intenção de compra de bebida láctea fermentada carbonatada.

Material e Métodos

Material

Os ingredientes utilizados nas formulações de bebidas lácteas foram água potável, açúcar refinado (União), leite em pó desnatado (Itambé), soro de leite em pó (Allibra), xarope de glucose (Cargill), estabilizante pectina (Doce Aroma), gás dióxido de carbono (White Martins), corante artificial vermelho Ponceau 4R (Duas Rodas), aroma idêntico ao natural morango (Duas Rodas) e as culturas lácticas *Lactobacillus acidophilus* (LA-5),

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* (Bb-12) e *Streptococcus thermophilus* (Biorich, Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca).

Elaboração das bebidas lácteas

O processamento e as formulações das bebidas foram estabelecidos conforme recomendações da empresa Chr. Hansen. Foram elaboradas quatro formulações de bebidas lácteas sabor morango: Controle (BL), Carbonatada (BLC), Fermentada (BLF) e Fermentada Carbonatada (BLFC). As proporções dos ingredientes da formulação das bebidas lácteas, em relação ao produto final foram: açúcar refinado (8%), leite em pó desnatado (3,8%), soro de leite em pó (1,6%), xarope de glicose (0,6%), pectina (0,3%), corante artificial vermelho Ponceau 4R (0,01%) e aromatizante idêntico ao natural morango (0,05%). Nas bebidas fermentadas, utilizou-se o fermento lácteo na proporção de 0,01%. O processamento e as formulações das bebidas foram estabelecidos conforme recomendações da empresa Chr. Hansen.

O processamento da bebida foi dividido em dois blocos: a) base constituída do leite em pó, soro de leite em pó e xarope de glicose dissolvidos em 30% de água e b) xarope composto de açúcar e pectina dissolvidos em 70% de água. No caso específico das bebidas BLC e BLFC, o xarope continha 30% de água, pois o restante (40%) foi incorporado no processo de carbonatação.

A base e o xarope foram colocados, separadamente, em tanques de inox encamisados providos de agitador, sendo submetidos ao tratamento térmico adotando-se o binômio tempo x temperatura, respectivamente de 85°C por 20 minutos e 90°C por 30 minutos, seguido do resfriamento até 40°C em um banho de gelo. Em seguida, o corante e o aromatizante foram adicionados ao xarope em condições de higiene.

O fermento lácteo foi adicionado à base nas BLF e BLFC com homogeneização manual da mistura por 2 minutos. A base foi mantida em estufa a $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ até atingir o pH de $4,8\pm 0,1$, valor recomendado por THAMER e PENNA (2006), o qual foi atingido em aproximadamente 7 horas.

A base (fermentada ou não) e o xarope foram levados a um homogeneizador (Skymssen) em condições de higiene para mistura, constituindo as bebidas lácteas.

As bebidas (BL e BLF) foram envasadas manualmente em garrafas plásticas de polietileno tereftalato (PET) com capacidade 250 mL com tampa de polipropileno (PP), sendo mantidas sob refrigeração a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara fria durante 28 dias de armazenamento.

As bebidas (BLC e BLFC) foram levadas a um tanque post-mix de aço inox, acoplado a um dispositivo de injeção de água potável misturada a gás dióxido de carbono (CO_2) de grau alimentício, sendo o gás mantido em cilindros herméticos em condições de alta pressão (Figura 2). A injeção de gás foi realizada nas condições de $0,5 \text{ kg/cm}^2$ de pressão e temperatura de 4°C , resultando em uma proporção de 2:1 (v/v), ou seja, dois volumes de CO_2 por volume de bebida láctea. Ato contínuo, as bebidas foram imediatamente envasadas em frascos plásticos de polietileno tereftalato (PET) com capacidade 250 mL com tampa de polipropileno (PP), sendo mantidas sob refrigeração a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara fria durante 28 dias de armazenamento.

O processamento das bebidas lácteas foi realizado nas instalações do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM) e Indústria de Refrigerantes Golé, sediados em Uberaba, MG. As análises sensoriais foram conduzidas no laboratório sensorial do IFTM.

Métodos

Análises sensoriais

Foram efetuados os testes sensoriais afetivos de aceitação e intenção de compra das quatro formulações de bebidas nos tempos 7 e 21 dias de armazenamentos das bebidas sob refrigeração. Foram recrutados 50 julgadores não treinados dentre alunos, professores e funcionários do IFTM. Os julgadores foram selecionados em função de consumo periódico de leites fermentados e/ou bebidas lácteas e terem disponibilidade e interesse em participar do teste. Os testes foram realizados em cabines individuais sob luz branca. As amostras codificadas com números de três dígitos foram apresentadas de forma monádica em copos brancos descartáveis, com aproximadamente 20 mL de conteúdo. A temperatura de apresentação foi de 7-10°C.

No teste de aceitação, os atributos cor, aroma, textura, sabor, acidez, e refrescância foram avaliados para cada formulação com a utilização de uma ficha contendo uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, onde 1 = desgostei muitíssimo e 9 = gostei muitíssimo. Para a intenção de compra foi adotada a mesma ficha contendo uma escala estruturada de cinco pontos, variando de 1 = certamente não compraria e 5 = certamente compraria (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1991; IAL, 2005).

Planejamento experimental e análise dos resultados

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados para o teste sensorial de aceitação. Todos os resultados foram submetidos aos testes de normalidade Shapiro Wilk e Bartlett, a fim de verificar se os mesmos apresentavam distribuição normal e se tinham homocedasticidade, respectivamente. Quando estas existiam, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Scott-Knott a 5% de significância ou análise de regressão. Quando estas não existiam, o estudo comparativo das médias dos diferentes

tratamentos foi realizado com base nos testes não paramétricos de Friedman a 5% de significância.

Utilizou-se o programa SISVAR v.5.1 (FERREIRA, 2011) para análise de variância e teste de média e o ASSISTAT v.7.4 (SILVA, 2007) para os testes de normalidade, homocedasticidade e teste não paramétrico. Para a intenção de compra, foram tabulados os resultados em porcentagem, variando de eu certamente não compraria até eu certamente compraria o produto.

Resultados e Discussão

Os resultados da análise sensorial realizada no tempo 7 dias (Tabela 1) indicaram que para cor, textura, sabor, acidez e refrescância, o teste de Friedman foi significativo ($p < 0,05$), ou seja, existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos. Já para aroma o teste de Friedman foi não significativo, indicando que as bebidas não diferiram entre si.

Observou-se que para o atributo cor, as bebidas BL, BLF e BLFC não diferiram entre si e apresentaram notas médias superiores a BLC, que diferiu das demais, ao nível de 5%. Para Textura, a nota média atribuída a BLF diferiu das demais e foi superior, seguida da BLFC, que não diferiu da BLC. A bebida BLC também não diferiu da BL, que apresentou menor valor.

A bebida BLF, em relação ao sabor, diferiu das BLC e BLFC e apresentou nota média superior, sendo que a BLC e BLFC não diferiram entre si. Para o atributo acidez, não houve diferença significativas entre as bebidas BL e BLF, que apresentaram notas médias superiores às demais. As BLC e BLFC apresentaram resultados inferiores e não diferiram entre si.

Quanto à refrescância, a bebida BLF apresentou resultados superiores e significativos em relação às demais, seguidos dos resultados da BL, sendo que as bebidas BLC e BLFC não diferiram entre si e apresentaram os menores valores para este atributo.

TABELA 1– Resultados sensoriais do teste de aceitação realizado por 50 julgadores não treinados nas amostras de bebidas lácteas sabor morango no tempo 7 dias de armazenamento refrigerado.

Amostras	Cor	Aroma	Textura	Sabor	Acidez	Refrescância
BL	7,70±1,07 ^a	7,44±1,25 ^a	5,42±1,76 ^c	6,62±1,72 ^{ab}	7,00±1,67 ^a	7,18±1,61 ^b
BLF	7,92±1,50 ^a	7,58±1,21 ^a	7,24±1,45 ^a	7,30±1,47 ^a	7,22±1,67 ^a	7,86±1,20 ^a
BLC	6,68±1,81 ^b	7,06±2,08 ^a	5,60±2,09 ^{bc}	5,40±2,45 ^c	4,84±2,33 ^b	5,90±2,43 ^c
BLFC	7,46±1,69 ^a	7,48±0,99 ^a	6,40±1,64 ^b	6,40±1,37 ^{bc}	5,14±2,21 ^b	6,38±2,02 ^c

^{a,b,c} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelos testes não paramétricos de Friedman ($p < 0,05$).

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Os resultados da análise sensorial realizada no tempo 21 dias (Tabela 2) indicaram que para cor, textura, sabor, acidez e refrescância, o teste de Friedman foi significativo ($p < 0,05$), ou seja, existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos. Já para aroma, o teste de Friedman foi não significativo, indicando que as bebidas não diferiram entre si.

TABELA 2– Resultados sensoriais do teste de aceitação realizado por 50 julgadores não treinados nas amostras de bebidas lácteas sabor morango no tempo 21 dias de armazenamento refrigerado.

Amostras	Cor	Aroma	Textura	Sabor	Acidez	Refrescância
BL	6,90±1,43 ^b	7,00±1,71 ^a	5,08±2,11 ^c	5,62±2,23 ^c	6,06±2,31 ^b	6,82±1,97 ^b
BLF	8,00±0,90 ^a	7,82±1,19 ^a	7,64±1,31 ^a	7,78±1,23 ^a	7,18±1,90 ^a	7,96±1,24 ^a
BLC	6,98±1,72 ^b	7,54±1,46 ^a	6,44±2,03 ^b	6,04±2,22 ^b	5,62±2,44 ^{bc}	6,32±2,12 ^{bc}
BLFC	7,06±1,73 ^b	7,60±1,20 ^a	5,86±1,63 ^{bc}	5,60±1,69 ^c	4,68±2,04 ^c	5,96±1,98 ^c

^{a,b,c} Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelos testes não paramétricos de Friedman ($p < 0,05$).

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Observou-se que para o atributo cor, as bebidas BL, BLC e BLFC não diferiram entre si e apresentaram notas médias inferiores a BLF, que diferiu das demais, ao nível de 5%. Para textura, a nota média da bebida BLF diferiu das demais e foi superior. A BL apresentou nota média inferior, não diferindo da BLFC. A bebida BLFC não diferiu também da BLC.

A bebida BLF, em relação ao sabor, diferiu das demais e apresentou nota média superior, enquanto que a BL e a BLFC não diferiram entre si e foram as que apresentaram menor nota média, sendo que a BLC apresentou nota intermediária e diferiu de todas. No atributo acidez, verificou-se que a BLF teve a maior nota média e diferiu das outras. A BLFC apresentou menor média e não diferiu da BLC, enquanto a BL apresentou resultado intermediário e também não diferiu da BLC. Quanto à refrescância, as bebidas BL, BLF e BLFC se diferiram entre si e entre as demais, ressaltando que a BLF teve maior nota média e a BLC não diferiu da BL e BLFC.

Houve uma aceitação sensorial superior pela BLF, com médias acima de 7,00 em todos os atributos e em todos os tempos. A partir destes resultados satisfatórios, constatou-se que a atividade fermentativa de bactérias lácticas na bebida láctea promoveu um incremento de suas características sensoriais.

Considerando o tempo 7 dias, houve uma preferência geral pela BLF, seguida pelas bebidas BL, BLFC e BLC. No tempo 21 dias, novamente a BLF foi a mais aceita, seguida pelas bebidas BLC, BL e BLFC. Houve, portanto, uma melhora de aceitação pela BLC pelo efeito do tempo de armazenamento.

A BLFC apresentou, em geral, menores médias de aceitação, mas seus resultados foram muito próximos aos alcançados pela BLC, com diferenças apenas na cor (tempo 7 dias) e sabor (tempo 21 dias). Uma hipótese para a menor aceitação pela BLFC pode ser baseada em GURGEL e OLIVEIRA (1995), que observaram que valores de pH de 4,06 a 4,39 em iogurtes implicam em diminuição da aceitação do produto, sendo que a amostra BLFC apresentava baixo pH em relação as demais, pela atividade fermentativa dos cultivos lácticos somado a presença de CO₂, que promove a acidificação do meio.

A bebida BLC apresentou aceitação moderada, quando comparada a BLF, o que também foi verificado em trabalho de YAU; MCDANIEL; BODYFELT (1989), que atingiu 50% de aprovação pelas bebidas carbonatadas a base de leite com adição de suco concentrado de frutas vermelhas por julgadores não treinados.

Iogurte de morango carbonatado foi aceito por 89,8% dos julgadores sendo que apenas 5,1% não gostaram do iogurte carbonatado (CHOI; KOSIKOWSKI, 1985). Um painel sensorial formado por consumidores reportaram uma preferência (77,2%) por iogurte carbonatado e destacaram a característica de sabor refrescante (OGDEN, 1997). Analisando as médias obtidas pelas BLC e BLFC, pode-se dizer que houve uma aceitação

positiva, pois as notas gerais de todos os atributos foram superiores a 4,50 (escala variando de 1 a 9), ou seja, houve mais de 50% de aceitação.

YAU; MCDANIEL; BODYFELT (1989) verificaram nas bebidas carbonatadas o realce do flavor, textura incomum e não refrescância, conforme avaliação de julgadores treinados. No presente trabalho, as notas atribuídas pelos julgadores foram inferiores para sabor e refrescância no tempo 7 dias e superiores em relação aos atributos sabor e textura no tempo 21 dias para BLC em comparação com a BL. Estes resultados indicaram que, em média, houve aumento da aceitação pela BLC em relação à BL pelo efeito tempo de armazenamento.

LEDERER; BODYFELT; McDANIEL (1991) detectaram que julgadores treinados correlacionaram maiores níveis de carbonatação (1,42 volume de CO₂/volume da bebida, v/v) com o aumento das intensidades da acidez, efervescência, amargor e adstringência em leites flavorizados. Os julgadores empregados no presente estudo atribuíram notas menores em relação aos itens acidez e refrescância. Uma hipótese seria que as intensidades destes atributos percebidas pelos julgadores foram superiores, mas não obtiveram boa aceitação, sendo influenciadas pelo nível de carbonatação das bebidas (1,95±0,13 v/v).

KARAGÜL-YÜCEER et al. (1999) indicaram que os julgadores não perceberam variações no flavor e textura pela influência da carbonatação em iogurtes chegaram a conclusão de que o desenvolvimento de adequados procedimentos de carbonatação são fundamentais para o incremento do flavor e textura de iogurtes carbonatados. Os julgadores atribuíram notas superiores à textura e ao sabor na BLF em comparação com a BLFC, ou seja, a carbonatação não contribui para a maior aceitação sensorial das bebidas.

VINDEROLA et al. (2000) observaram que o uso do CO₂ não possui efeitos negativos nas características sensoriais do leite fermentado pois as notas atribuídas por julgadores treinados aos atributos textura, sabor e acidez foram ligeiramente superiores nas

amostras carbonatadas. Estes resultados não corroboram com os alcançados no presente estudo, pois BLF apresentou maiores médias para os atributos textura, sabor e acidez em comparação com a BLFC, com diferenças significativas nos dois tempos analisados.

Como a presença de CO₂ está correlacionada com a intensidade da refrescância, esperavam-se notas superiores neste atributo para as bebidas lácteas carbonatadas, mas os julgadores não julgaram positiva esta característica, já que em geral as bebidas não carbonatadas apresentaram resultados superiores, o que também foi alcançado por YAU; MCDANIEL; BODYFELT (1989). Sugere-se que em trabalhos futuros, adequações possam ser feitas quanto à definição do volume de CO₂ incorporado à bebida e quanto ao recrutamento dos julgadores para que sejam orientados a compreender o conceito “leite carbonatado”

NORIEGA et al. (2003) observaram diferenças sensoriais nos atributos sabor e acidez, com maior aceitação pelas amostras de leite carbonatado fermentado por *Bifidobacterium infantis* em relação às amostras não carbonatadas no tempo 24 dias de armazenamento refrigerado. Estes resultados não foram confirmados neste trabalho, pois houve preferência geral pela BLF em comparação com a BLFC nos atributos sabor e acidez em todos os tempos.

RAVINDRA et al. (2011) obtiveram resultados sensoriais que indicaram menores notas de aceitação por bebidas a base de leite carbonatadas em comparação com a amostra controle para sabor, consistência (textura) e aceitabilidade global. Neste trabalho, em relação aos atributos sabor e textura, a BLC foi mais aceita em relação à BL, considerando o tempo 21 dias. No tempo 7 dias, a BL foi preferida em relação ao sabor e quanto a textura, não houve diferença entre BL e BLC. Portanto, em geral, a bebida láctea carbonatada (BLC) obteve melhores médias em comparação com a bebida controle (BL) nos quesitos sabor e textura.

Na pesquisa de RAVINDRA et al. (2011), os julgadores conferiram à bebida carbonatada a característica de ligeira refrescância (expressa como “apenas detectável”). Diante das notas menores, em média, atribuídas às bebidas BLC e BLFC para o atributo refrescância, supõe-se que os níveis de carbonatação devem ser bem estudados para refletirem em melhor aceitação sensorial.

Os resultados do teste de intenção de compra indicaram valores superiores para BLF nos tempos 7 e 21 dias, respectivamente 76% e 74% de intenção positiva. Os menores percentuais de intenção de compra nos tempos 7 e 21 dias foram obtidos pela BL, respectivamente, 34% e 22% e pela BLFC, respectivamente, 38% e 18%. A bebida BLC apresentou resultado intermediário, 41% e 35% de intenção positiva nos tempos 7 e 21 dias (Figuras 1 e 2).

O percentual de indecisos, que assinalaram o quesito “tenho dúvidas se compraria o produto” foi alto para todas as bebidas, com exceção apenas da BLF, cujos percentuais foram bem superiores nos quesitos “eu provavelmente compraria o produto” e “eu certamente compraria o produto”.

A indecisão do consumidor quanto às bebidas BLC e BLFC pode ter acontecido pela não familiarização com a carbonatação em bebida láctea. Como a BLC apresentou intenção de compra superior à bebida controle, pode-se afirmar que existe um potencial de inserção desta no mercado.

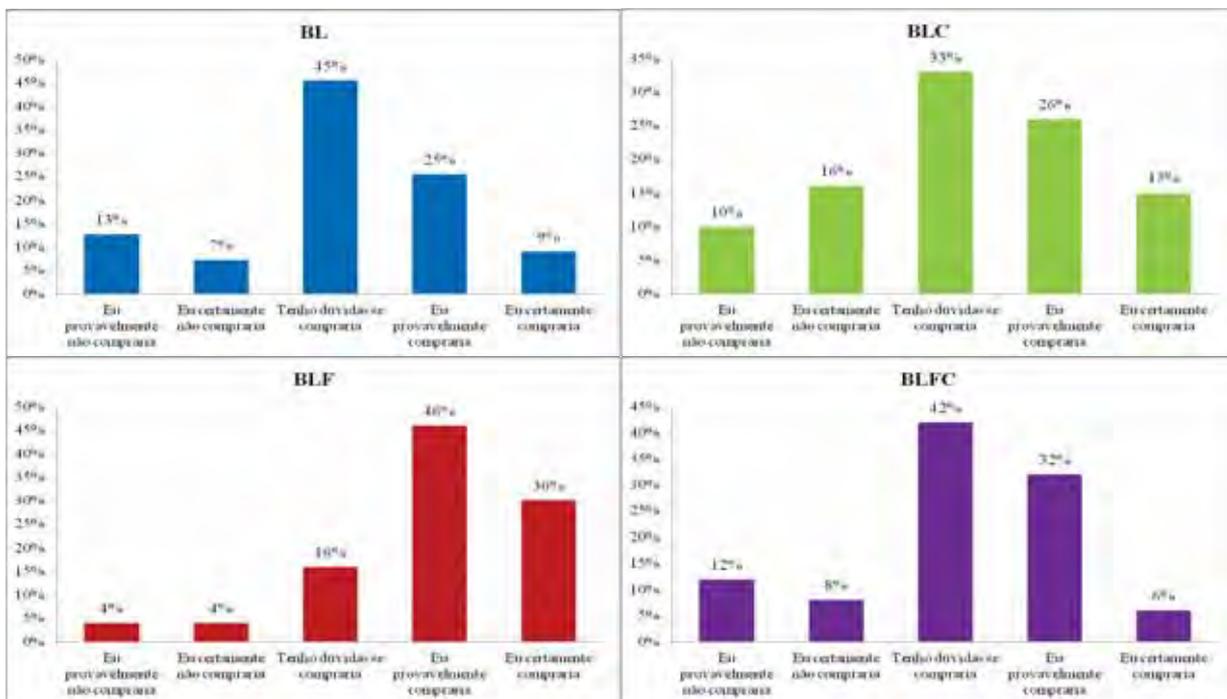


FIGURA 1– Resultados sensoriais de teste de intenção de compra (%) realizado por 50 julgadores não treinados nas amostras de bebidas lácteas sabor morango no tempo 7 dias de armazenamento refrigerado.

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

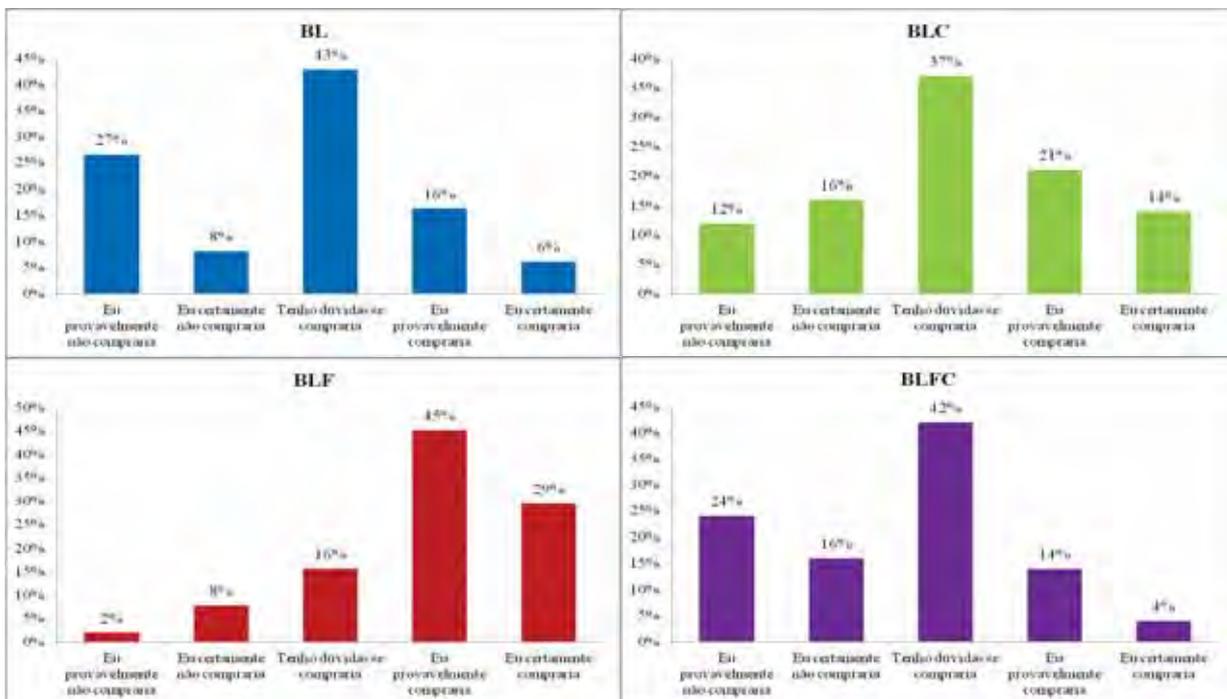


FIGURA 2– Resultados sensoriais de teste de intenção de compra (%) realizado por 50 julgadores não treinados nas amostras de bebidas lácteas sabor morango no tempo 21 dias de armazenamento refrigerado.

BL = Bebida Láctea (controle); BLC = Bebida Láctea Carbonatada; BLF= Bebida Láctea Fermentada; BLFC= Bebida Láctea Fermentada Carbonatada

Conclusões

Com os resultados obtidos das análises sensoriais, verificou-se que a BLF apresentou resultados sensoriais mais satisfatórios, tanto no teste de aceitação como no teste de intenção de compra, significando que a ação fermentativa das bactérias lácticas incrementa as características sensoriais da bebida láctea. A BLFC obteve menores médias de aceitação, provavelmente relacionadas com a característica de pH mais reduzido da bebida.

A bebida láctea carbonatada (BLC) obteve resultados sensoriais intermediários, mas indicaram potencialidade do uso de CO₂ como um atrativo sensorial em produtos lácteos. Deve-se, no entanto, promover os consumidores a se familiarizarem com produtos carbonatados de base láctea.

Referências

- AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw milk with CO₂: sensory evaluation of heat-processed milks. **Z. Lebensm. Unders. Forsch.**, v. 200, p. 293-296, 1995.
- CHOI, H. S.; KOSIKOWSKI, F. V. Sweetened plain and flavored carbonated yogurt beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 613-619, 1985.
- DUTHIE, C. M.; SHIPE, W. F.; HOTCHKISS, J. H. Effect of low level carbonation on the keeping quality of processed milk (abstr). **J. Dairy Res.**, v. 68, supp. 1, p. 69, 1985.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados**. Versão 5.1. Lavras: DEX/UFLA, 2011.
- GURGEL, M. S. C. C. A.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. **Leite & Derivados**, v. 4, n. 22, p. 38-43, 1995.
- GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; DELGADO, T.; BADA-GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk. **Food Res. Int.**, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2005. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7>. Acesso em: 07 jan. 2009.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; COGGINS, P. C.; WILSON, J. C.; WHITE, C. H. Carbonated yogurt – sensory properties and consumer acceptance. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 1394-1398, 1999.

LEDERER, C. L.; BODYFELT, F. W.; McDANIEL, M. R. The effect of carbonation level on the sensory properties of flavored milk beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 2100-2108, 1991.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 1991. 354 p.

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; ALONSO, L.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. **Food Microbiol.**, v. 20, p. 519–526, 2003.

OGDEN, L. V. **Process to produce carbonated semi-solid or solid food and the product thereof**. Brigham Young Univ. Provo, UT, assignee. US Pat. N^o. 5, 624,700, 1997.

OLIVEIRA, M. N. de; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

PERI, C. The universe of food quality. **Food Quality and Preference**, v. 17, p. 3–8, 2006.

RAVINDRA, M. R.; RAO, K. J.; NATH, B. S.; RAM, C. Extended shelf life flavoured dairy drink using dissolved carbon dioxide. **J. Food Sci. Technol.**, 03 ago. 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/m6213634u159uq67/fulltext.pdf> >. Acesso em: 26 nov. 2011.

RUAS-MADIEDO, P, BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; GONZALEZ DE LLANO, D.; DE LOS REYES-GAVILAN, C. G. Preservation of the microbiological and

biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 502–508, 1996.

SILVA, F. A. S. e. **ASSISTAT**: Assistência Estatística Versão 7.4 Beta. 2007. Disponível em: <<http://downloads.aonde.com/download/11229/assistat---assistencia-estatistica.htm>>. Acesso em: 10 set. 2011.

SOUZA, T. D. S.; YUHARA, T. T.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H.; GARCIA, S. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, n. 1, p. 27-34, 2007.

TEBALDI, V. M. R. Elaboração de bebida láctea de soro de ricota e extrato solúvel de soja. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

VINDEROLA, C. G.; GUEIMONDE, M.; DELGADO, T.; REINHEIMER, J. A.; REYES-GAVILÁN, C. G. de los. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, v. 10, p. 213-220, 2000.

YAU, N. J. N.; McDANIEL, M. R.; BODYFELT, F. W. Sensory evaluation of sweetened flavored carbonated milk beverages. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 367-377, 1989.

CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas de fermentação e carbonatação de bebidas lácteas são viáveis, pois promoveram maior estabilidade físico-química, principalmente pelos menores índices de proteólise, resultados de seus efeitos em valores reduzidos de pH, superiores de acidez e a presença das bactérias lácticas e CO₂ nas formulações.

A fermentação apresentou um efeito inibitório do crescimento dos contaminantes coliformes totais e leveduras nas bebidas e a carbonatação contribuiu para retardar o crescimento dos contaminantes, sendo métodos eficazes para aumentar a vida útil de bebidas lácteas.

A presença de CO₂ exerceu um efeito negativo na viabilidade dos cultivos lácteos *Streptococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp., mas as reduções nas contagens do gênero *Lactobacillus* spp. foram superiores na bebida fermentada em comparação com a bebida fermentada carbonatada.

A bebida láctea fermentada apresentou resultados sensoriais superiores em relação às demais bebidas, tanto nos testes de aceitação como no teste de intenção de compra, porém a bebida láctea carbonatada apresentou resultados intermediários, mas satisfatórios, que representaram possibilidades de inserção da mesma no mercado.

Novos estudos são pertinentes com a tecnologia de carbonatação em bebidas lácteas, com possíveis ajustes nas formulações e nos níveis de concentração de CO₂.