

Terezinha Martinez Hernandez Rino

“Avaliação da Vida de Prateleira de uma
Bebida Láctea Fermentada”

1910001319



TEREZINHA MARTINEZ HERNANDES RINO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ÁREA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**“AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE UMA
BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA”**

TEREZINHA MARTINEZ HERNANDES RINO

**Dissertação para obtenção do título de
Mestre apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual
Paulista, de São José do Rio Preto, na
área de concentração em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: PROF. DR. ELIZEU TRABUCO

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2004**



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
ÁREA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TEREZINHA MARTINEZ HERNANDES RINO

**“AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE UMA
BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA”**



T. 1.319/05

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2004



4637,146

R582a

13/01/2005

Doação

R\$ 23,00

Autor(a)

076/2005

Rino, Terezinha.

Avaliação da vida de prateleira de uma bebida láctea fermentada /
Terezinha Martinez Hernandez Rino. - São José do Rio Preto : [s.n.],
2004

83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Elizeu Trabuco

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Leite fermentado. 2. Bebida láctea. 3. Leite fermentado -
Armazenamento. I. Trabuco, Elizeu. II. Universidade Estadual
Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 637.141.8



TEREZINHA MARTINEZ HERNANDES RINO

**“AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE UMA
BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA”**

**Dissertação para obtenção do título de
Mestre apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual
Paulista, de São José do Rio Preto, na
área de concentração em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.**

COMISSÃO JULGADORA:

Professor Dr. Elizeu Trabuço - UNESP

Professora Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna - UNESP

Professora Dr^a. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards – UNISINOS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
____/____/ 2004



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Elizeu Trabuco, pela orientação e pela disponibilidade, durante o desenvolver desse trabalho.

À Profª. Drª. Ana Lúcia Barreto Penna, que participou ativamente desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Háscolo, pelo ensino das técnicas, no laboratório de Química do IBILCE.

Ao Sr. Manoel Dicanhoso D. de Sousa, pelo apoio e incentivo desde o início.

A Fernanda, pelos conhecimentos compartilhados, e pela amizade que existiu nos longos da escola.

Ao Ulisses e Karen, pelo carinho, puro e verdadeiro.

Aos funcionários de Cooperativa de Laticínios de Promissão, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

A Deus, por suas obras em meu caminho.

À minha Família, pelo apoio e compreensão.

A UNESP, pela oportunidade concedida.



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Elizeu Trabuco, pela orientação e pela disponibilidade, durante o desenvolver desse trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Barretto Penna, que participou ativamente desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Bôscolo, pelo ensino das técnicas, no laboratório de Química do IBILCE .

Ao Sr. Manuel Diamantino D. de Sousa, pelo apoio e incentivo desde o início.

À Fernanda, pelos conhecimentos compartilhados, e pela amizade que extrapola os limites da escola.

Ao Ulisses e Karen, pelo carinho, puro e verdadeiro.

Aos funcionários da Cooperativa de Laticínios de Promissão, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À UNESP, pela oportunidade concedida.



conforme aumento no tempo de estocagem, nas três temperaturas estudadas. A bebida láctea mostrou-se estável e com condições apropriadas para o consumo após 30 dias, quando estocada a 7°C, porém ao elevar-se a temperatura de conservação, para 25°C e 37°C , a bebida mostrou-se inadequada para o consumo.

Palavras-chave: leite fermentado, bebida láctea, vida de prateleira.

RESUMO

Uma bebida láctea fermentada foi preparada e armazenada em temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C para avaliação de suas características físico-químicas (gordura, sólidos totais, cinzas, pH, acidez, proteínas, nitrogênio não protéico e nitrogênio não caseico), microbiológicas (contagem das bactérias lácticas, pesquisa de coliformes, bolores e leveduras), sensoriais (“consistência”, “sabor e aroma” e “aceitabilidade geral”) e de seus compostos químicos voláteis. As análises foram realizadas semanalmente durante 35 dias.

A bebida láctea revelou ser um produto estável, com leve aumento nos valores de acidez titulável e nas frações de nitrogênio solúvel, quando armazenada a 7°C; atendeu aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação; e, na avaliação sensorial, teve boa aceitação pelos provadores, com média de 7,65, correspondendo a 85% da escala hedônica de 9 pontos, representada pela categoria “gostei extremamente”, durante todo o período de estocagem. Na estocagem a 25°C e 37°C, o produto sofreu alterações físico-químicas e microbiológicas significativas, com queda acentuada do pH e do número de bactérias lácticas viáveis, bem como um aumento nos valores da acidez titulável, de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (nitrogênio não caseico) e de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (nitrogênio não protéico). As análises sensoriais da bebida mantida nessas temperaturas apresentaram no 21º dia, médias de 3,96 e 2,19, respectivamente, correspondendo a 44% e 24% da escala hedônica de 9 pontos, representadas pelas categorias “desgostei moderadamente” e “desgostei extremamente”.

As análises cromatográficas indicaram a presença de acetaldeído, em quantidades aproximadas, em todas as amostras analisadas, durante todo o período avaliado, independente da temperatura de estocagem da bebida. Os compostos voláteis presentes no aroma natural de morango adicionado ao produto apresentaram queda em seus níveis,

ABSTRACT

A fermented dairy beverage was prepared and stored at temperatures of 7°C, 25°C and 37°C for the evaluation in its physical-chemical (fat, total solids, ashes, pH, acidity, protein, non-proteic nitrogen, non-caseic nitrogen), microbiological (lactic bacteria, coliform, mold and yeast) counts, sensorial ("consistency", "flavor" and "acceptability") characteristics and its volatile chemical compounds. The analysis were made weekly, during 35 days.

The beverage was stable when stored at 7°C, with a small increase in acidity values and soluble nitrogen fractions; obeying the microbiologic standards established by law and in the sensorial evaluation, there was good acceptance by the tasters; the average was 7,65, which corresponds to 85% of the 9 point scale, represented by the category "I extremely liked it", during all the storage period. In the storage temperatures of at 25°C and 37°C, the beverage underwent significant physical-chemical and microbiological alterations, with a large decrease of the pH value and in the number of viable lactic bacteria. It has also been observed an increase in the values of acidity, of the soluble nitrogen at pH 4,6 and soluble nitrogen in TCA (trichloroacetic acid). The sensorial evaluation of the beverage kept in these temperatures showed, on the 21th day to be an average of 3,96 and 2,90, respectively, which corresponds to 44% and 24% of the 9 point scale, represented by the category "I disliked it moderately" and "I disliked it extremely".

The chromatographic analysis showed the presence of acetaldehyde in similar quantities, in all the analyzed samples during the whole period, independent of the storing temperature of the beverage. The volatile compounds found in the natural aroma of strawberry added to the product, showed a decrease in its levels depending on the increase of the storage time in the three studied temperatures. The milk dairy beverage was shown to be stable and appropriate for consumption after 30 days when stored at 7°C, but when the

temperature was raised to 25°C and 37°C, the beverage was shown to be inadequate for consumption.

Figura 1 - Efeito da temperatura de incubação na proporção coliform/bacilos 28

Key-words: milk fermented, dairy beverage, shelf-life.

Figura 2 - Vida de prateleira das bebidas lácteas em função da temperatura de estocagem 31

Figura 3 - Produção de acetaldéido por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 35

Figura 4 - Representação esquemática de três reações diferentes em função da temperatura 38

Figura 5 - Fluxograma do processamento da bebida láctea 44

Figura 6 - Ficha utilizada para a avaliação de aceitabilidade da bebida láctea 48

Figura 7 - Valores médios de pH e acidez titulável da bebida durante a estocagem 57

Figura 8 - Cromatograma típico da bebida láctea fermentada 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito da temperatura de incubação na proporção cocos/bacilos.	28
Figura 2 - Vida de prateleira das bebidas lácteas em função da temperatura de estocagem.	31
Figura 3 - Produção de acetaldeído por <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	35
Figura 4 - Representação esquemática de três reações diferentes em função da temperatura.	38
Figura 5 - Fluxograma do processamento da bebida láctea.	44
Figura 6 - Ficha utilizada para a avaliação de aceitabilidade da bebida láctea.	48
Figura 7 - Valores médios de pH e acidez titulável da bebida durante a estocagem.	57
Figura 8 - Cromatograma típico da bebida láctea fermentada.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliações durante a vida de prateleira de bebidas lácteas.	39
Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão das análises do leite pasteurizado utilizado na elaboração da bebida láctea.	51
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão das análises do soro de leite pasteurizado utilizado na elaboração da bebida láctea.	52
Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco 1).	55
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco 2).	56
Tabela 6 - Média dos resultados obtidos das contagens das bactérias lácticas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco1).	59
Tabela 7 - Média dos resultados obtidos das contagens das bactérias lácticas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco2).	60
Tabela 8 - Média dos resultados obtidos na avaliação sensorial da bebida láctea (bloco1).	61



Tabela 9 - Média dos resultados obtidos na avaliação sensorial da bebida láctea (bloco2).	62
--	----

Tabela 10 - Média dos resultados e desvio padrão da razão de áreas do acetaldeído e dos componentes do aroma de morango, em relação ao padrão interno, presentes na bebida láctea, obtidos por cromatografia gasosa, durante os 35 dias de estocagem (Bloco 1).	64
--	----

Tabela 11 - Média dos resultados e desvio padrão da razão de áreas do acetaldeído e dos componentes do aroma de morango, em relação ao padrão interno, presentes na bebida láctea, obtidos por cromatografia gasosa, durante os 35 dias de estocagem (Bloco 2).	64
--	----

**Apêndice H - Cromatogramas da bebida láctea realizados na primeira e quinta
semanas de estocagem à 37°C.**

83

Apêndice A - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre o valor de
pH (a) e a acidez titulável (b) da bebida láctea 76

Apêndice B - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre o nitrogênio
não caseiro (a) e o nitrogênio não proteico (b) da bebida láctea 77

Apêndice C - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a contagem
de *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e total das bactérias
láticas (c) da bebida láctea 78

Apêndice D - Efeito do tempo e temperatura de estocagem sobre a "acortação
global" (a), "consistência" (b) e "sabores e aromas" (c) da bebida láctea 79

Apêndice E - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nos níveis do
acetaldeído (a), e dos compostos I (b) e II (c), do aroma de morango,
adicionado à bebida láctea 80

Apêndice F - Cromatogramas da bebida láctea realizados na segunda (a) e na
terceira semanas (b) de estocagem à 37°C 81

Apêndice G - Cromatogramas da bebida láctea realizados na terceira (a) e
quarta semanas (b) de estocagem à 25°C 82

APÊNDICES

Apêndice A - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre o valor de pH (a) e a acidez titulável (b) da bebida láctea.	76
Apêndice B - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre o nitrogênio não caseico (a) e o nitrogênio não protéico (b) da bebida láctea.	77
Apêndice C - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a contagem de <i>S. thermophilus</i> (a), <i>L. bulgaricus</i> (b) e total das bactérias lácticas (c) da bebida láctea.	78
Apêndice D - Efeito do tempo e temperatura de estocagem sobre a “aceitação global” (a), “consistência” (b) e “sabor e aroma” (c) da bebida láctea.	79
Apêndice E - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nos níveis do acetaldeído (a), e dos compostos I (b) e II (c), do aroma de morango, adicionado à bebida láctea.	80
Apêndice F - Cromatogramas da bebida láctea realizados na segunda (a) e na terceira semanas (b) de estocagem à 7°C.	81
Apêndice G - Cromatogramas da bebida láctea realizados na terceira (a) e quarta semanas (b) de estocagem à 25°C.	82



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
	3.1 Bebida láctea	20
	3.2 Processo geral de fabricação	21
	3.2.1 Matéria-prima	21
	3.2.2 Padronização do conteúdo de gordura do leite	23
	3.2.3 Adição de açúcares e/ou agentes edulcorantes	23
	3.2.4 Adição de estabilizantes	24
	3.2.5 Homogeneização	25
	3.2.6 Tratamento térmico	25
	3.2.7 Processo de fermentação	26
	3.2.8 Adição de aromas, corantes e polpa de frutas	29
	3.2.9 Resfriamento, envase e estocagem	30
	3.3 O aroma dos leites fermentados	32
	3.3.1 Produção de acetaldeído	34
	3.4 Vida de prateleira	36
	3.4.1 Reações de transformação e cinética	36
	3.5 Determinação da vida de prateleira das bebidas lácteas	39



4	MATERIAL E MÉTODOS	41
	4.1 Matérias-primas	41
	4.2 Equipamentos	41
	4.3 Reagentes e meios de cultura	42
	4.4 Procedimento experimental para o obtenção da bebida láctea	43
	4.5 Métodos	45
	4.5.1 Análises físico-químicas	45
	4.5.2 Análises microbiológicas	46
	4.5.3 Análise sensorial	47
	4.5.4 Análise cromatográfica de alguns compostos voláteis	49
	4.5.5 Análise estatística	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
	5.1 Caracterização do leite e do soro de leite	51
	5.2 Caracterização físico-química da bebida láctea	53
	5.3 Caracterização microbiológica da bebida láctea	58
	5.4 Caracterização sensorial da bebida láctea	61
	5.5 Estudo de alguns compostos voláteis da bebida láctea	63
	5.6 Considerações finais	66



1 INTRODUÇÃO

CONCLUSÃO

68

REFERÊNCIAS

69

APÊNDICES

75

(LAGRANGE, HAMMOND, 1993).

A vida de prateleira dos alimentos ou estabilidade vida útil ou "shelf-life", como é referido internacionalmente, não é definida como o tempo em que o produto pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, etc., de modo a não sofrer grandes alterações em suas propriedades e características, as quais são, em certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (TEIXEIRA NETO et al., 1993).

Estudos de armazenamento para prever a vida de prateleira são parte essencial dos programas de desenvolvimento e manutenção de produtos. Colocar um produto no mercado sem conhecimentos prévios de suas possíveis alterações e deterioração é esperar pelo veredicto dos consumidores sob condições muitas das quais adversamente às vendas. Problemas relacionados com estabilidade durante o armazenamento são comuns na indústria de alimentos e, para manter a qualidade de um produto, os fabricantes devem conhecer e serem capazes de controlar as condições sob as quais os produtos são armazenados, distribuídos e disponibilizados à venda (ALMEIDA, FARIA, 1997).

O conhecimento da razão que leva um produto a deteriorar após a sua fabricação, e a forma de minimizar ou evitar essa deterioração, pode ser um fator determinante para o sucesso ou não de um produto no mercado. O fabricante deve se preocupar com o período de tempo e ambiente pelo qual o produto passa antes de ser comercializado e como essas condições afetam a sua qualidade (STONE, SIDEL, 1985).

1 INTRODUÇÃO

O modo de vida moderna exige produtos que tenham uma durabilidade de modo a suportar o armazenamento e o transporte. Assim as indústrias que processam leite freqüentemente procuram adequar o tempo de vida de prateleira de seus produtos (LAGRANGE; HAMMOND, 1993).

A vida de prateleira dos alimentos, ou estabilidade, vida útil ou “shelf-life”, como é referida internacionalmente, tem sido definida como o tempo em que o alimento pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc., de modo a não sofrer grandes alterações em suas propriedades e características, as quais são, até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (TEIXEIRA NETO et al., 1993).

Estudos de armazenamento para predizer a vida de prateleira são parte essencial dos programas de desenvolvimento e manutenção da qualidade de produtos. Colocar um produto no mercado sem conhecimento prévio de suas possíveis alterações é arriscado e esperar pelo veredicto dos consumidores toma tempo e dinheiro, podendo afetar adversamente as vendas. Problemas relacionados com estabilidade durante o armazenamento são comuns na indústria de alimentos e, para manter a qualidade de um produto, os fabricantes devem conhecer e serem capazes de controlar as condições sobre as quais eles são produzidos, armazenados, distribuídos e dispostos à venda (ALMEIDA; FARIA, 1997).

O conhecimento da razão que leva um produto a deteriorar após a sua fabricação, e a forma de minimizar ou inibir essa deterioração, pode ser um fator determinante para o sucesso ou não de um produto no mercado. O fabricante tem que se preocupar com o período de tempo e ambiente pelo qual o produto passa antes de ser consumido e como esses fatores afetam a sua qualidade (STONE; SIDEL, 1985).



A vida de prateleira de um produto é determinada basicamente em função dos componentes do sistema alimento/embalagem/ambiente: a sua composição, o processo usado na fabricação, as condições de higiene, os tipos e métodos de embalagem, o tempo médio de comercialização e consumo, a temperatura e a umidade relativa durante o transporte e o armazenamento (LABUZA, 1982).

O efeito de alguns fatores externos ao produto como a umidade relativa, a incidência de luz, a presença de oxigênio e de outros gases ou odores, podem ser controlados ou minimizados pelo uso de uma embalagem adequada; porém, a embalagem não pode controlar a temperatura em que o produto será exposto. Mesmo no caso de alimentos refrigerados e congelados, a flutuação de temperatura pode causar alterações no produto. Por isso, o efeito da temperatura nas reações físico-químicas, nas alterações sensoriais e crescimento microbiano é o mais investigado nos estudos de vida de prateleira (LABUZA, 1975).

A aceitabilidade de um produto pode ser medida pelo grau de satisfação do consumidor. O produto pode estar diferente de sua especificação inicial, mas ainda aceitável para uma parte dos consumidores, devendo-se decidir que porcentagem de consumidores será permitida ficar insatisfeita. Quanto menor esse valor, menor o risco, mas também, menor a vida de prateleira. O produto pode ainda ser aceitável pelo tempo que ainda falta de distribuição, nos casos em que a perda de qualidade é tão lenta que todo o produto poderá ser consumido antes que qualquer alteração significativa ocorra para causar a rejeição pelo consumidor (ALMEIDA; FARIA, 1997).

O primeiro passo para determinar a vida de prateleira das bebidas lácteas é identificar as características da matéria-prima, dos ingredientes e as condições de processamento e estocagem que poderão influenciar na perda de qualidade do produto. (SIVIERI, 2002).



2.3 OBJETIVO BIBLIOGRÁFICA

Avaliar a vida de prateleira de uma bebida láctea fermentada, durante seu período de comercialização, através de estudos em suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas entende-se por Bebida Láctea qualquer bebida a partir de leite (ou leite reconstituído) e/ou derivados de lactose, fermentados ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% (massa/massa) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2000).

O mesmo Regulamento define Bebida Láctea Fermentada como um produto lácteo, fermentado mediante a ação de bactérias ácido-láticas, e que não precisa ser submetido a tratamento térmico. Essa fermentação pode ser entendida como o processo metabólico no qual ocorrem mudanças químicas nos componentes orgânicos do leite, quais sejam, proteínas, carboidratos e gorduras, através da ação de enzimas elaboradas pelas bactérias lácticas. Os microrganismos utilizados na fermentação da bebida láctea são predominantemente as bactérias encontradas no iogurte: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, doravante denominados de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e o número total de bactérias viáveis deve ser no mínimo de 10^5 UFC/g, no produto final (SABOYA, OETTERER, OLIVEIRA, 1997).

O processo de fabricação de bebidas lácteas pode se iniciar com a mistura de iogurte e de soro em proporções adequadas ou ser baseada na mistura de leite e soro antes do processo fermentativo, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes e outros de acordo com a formulação do fabricante (SIVIERI, 2002).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a utilização do soro em quantidades que variam de 30 a 70% do total, confere às bebidas lácteas características próximas às do

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bebida láctea

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas entende-se por Bebida Láctea o produto obtido a partir de leite (ou leite reconstituído) e/ou derivados de leite (reconstituídos ou não), fermentados ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% (massa/massa) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2000).

O mesmo Regulamento define Bebida Láctea Fermentada como um produto lácteo, fermentado mediante a ação de bactérias ácido-láticas, e que não poderá ser submetido a tratamento térmico. Esta fermentação pode ser entendida como o processo metabólico no qual ocorrem mudanças químicas nos componentes orgânicos do leite, quais sejam, proteínas, carboidratos e gorduras, através da ação de enzimas elaboradas pelas bactérias lácticas. Os microrganismos utilizados na fermentação da bebida láctea são predominantemente as bactérias encontradas no iogurte: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, doravante denominados de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e o número total de bactérias viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

O processo de fabricação de bebidas lácteas pode se iniciar com a mistura de iogurte e de soro em proporções adequadas; ou ser baseada na mistura de leite e soro antes do processo fermentativo, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes e outros de acordo com a formulação do fabricante (SIVIERI, 2002).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a utilização do soro em quantidades que variam de 30 a 70% do total, confere às bebidas lácteas características próximas às do



iogurte natural em relação à coloração e aroma. A viscosidade pode variar de “relativamente baixa”, semelhante à de uma mistura de leite e suco de frutas, até “relativamente alta”, como a viscosidade dos tradicionais iogurtes para beber (SEIBEL; CANSIAN, 2000).

A produção de bebida láctea contendo de soro de leite em sua formulação tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido aos seus benefícios nutricionais, ao menor custo do produto para o fabricante, à redução do preço final para o consumidor e por apresentar baixa viscosidade, sendo consumida como bebida suave e refrescante (SANTOS; FERREIRA, 2001).

As principais regiões consumidoras de bebidas lácteas no Brasil são o Estado de São Paulo e as Regiões Sul e Nordeste. Desde 1994 essas bebidas têm tido lugar destacado no mercado brasileiro e em 1996 tomou 33% da categoria de lácteos fermentados. A Holanda é o país onde mais se consome produtos de leite fermentados, cerca de 14,7 kg/ano, contra 2,0 kg/ano por pessoa no Brasil. As classes que mais consomem esse tipo de produto no Brasil são aquelas com poder aquisitivo menor (classes D e E), representando 36,4% do mercado consumidor, seguidas pela classe C (32,5%). A faixa etária que aceita bem o produto é de 3 a 12 anos. Segundo dados da AC Nielsen, o consumo de produtos lácteos no Brasil tem registrado um crescimento médio de 5% ao ano, sendo que somente o segmento de iogurtes registrou em 2001 um consumo de 292,42 milhões de litros (SANTOS, 2002).

3.2 Processo geral de fabricação

3.2.1 Matéria-prima

O leite a ser utilizado na fabricação de produtos lácteos fermentados deve ser de boa qualidade, higienicamente produzido e manipulado, devendo ser conservado ao abrigo



da luz, de composição normal e isento de antibióticos e conservantes (RASIC; KURMANN, 1978).

Pode-se obter leites fermentados a partir de leite de todas as espécies, porém as mais comuns são de vaca, cabra e ovelha. A qualidade do leite determina sua aptidão para a fabricação desses produtos e por isso é necessário que suas proteínas não estejam desnaturadas. A proteólise se reduz controlando a população de microrganismos, e mantendo a temperatura de armazenamento suficientemente baixa para limitar a atividade das proteases microbianas ou naturais do leite (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

O soro é um subproduto da fabricação de queijo ou de caseína e pode ser definido como a fase aquosa do leite que permanece após a etapa de coagulação por meio ácido ou por enzimas proteolíticas e, devido ao seu valor nutritivo e às condições de umidade, temperatura e pH favoráveis ao crescimento microbiano, sua vida útil como produto inalterado é extremamente curta. A composição do soro pode variar substancialmente dependendo do tipo de queijo produzido ou do método de extração da caseína empregado. Os soros de leite podem ser classificados como:

- Soro doce: 10°D a 20°D e pH entre 5,8 a 6,6;
- Soro com acidez média: 20°D a 40°D e pH entre 5,0 e 5,8;
- Soro ácido: acidez $> 40^{\circ}\text{D}$ e pH $< 5,0$ (PEREIRA, 2002).

Para os laticínios, a utilização do soro para a fabricação de bebidas lácteas, é uma atrativa opção, devido à simplicidade do processo, que emprega os mesmos equipamentos do beneficiamento do leite, aliado às excelentes propriedades funcionais das proteínas presentes no soro (GANDHI; PATEL, 1994).



3.2.2 Padronização do conteúdo de gordura do leite

A padronização do leite depende do tipo de produto desejado: integral, padronizado, semi-desnatado ou dietético. O conteúdo de gordura dos distintos tipos de produtos lácteos fermentados, elaborados nas diferentes partes do mundo, varia de 0,1% a 10%, sendo necessário padronizar a composição do leite para cumprir as especificações das normas legais recomendadas (TAMIME; ROBINSON, 1991).

A teor de gordura do leite afeta o sabor dos leites fermentados e pode variar conforme o tipo de produto desejado. Nas bebidas desnatadas, o conteúdo de gordura deve ser menor que 0,5%, para as parcialmente desnatadas, deve ser entre 0,5 a 3% e, para as integrais, deve ser maior que 3% de gordura (BRASIL, 2000). A gordura estabiliza a contração do gel protéico, previne a separação do soro no produto final e afeta a percepção sensorial do produto, que apresenta textura mais macia e cremosa com o aumento do teor de gordura (RASIC; KURMAN, 1978). Thomopoulos, Tzia e Milkas (1993) observaram que o aumento no teor de gordura do leite elevou o conteúdo de acetaldeído e contribuiu para a melhoria do sabor e aroma do produto.

3.2.3 Adição de açúcares e/ou agentes edulcorantes

Normalmente, na elaboração dos iogurtes, se adicionam açúcares ou agentes edulcorantes, com a finalidade de atenuar a acidez do produto (TAMIME; ROBINSON, 1991). As bebidas lácteas fermentadas possuem valores de acidez semelhantes aos dos iogurtes, sendo a adição de açúcar também necessária para atenuar a acidez desses produtos.

A presença de carboidratos na mistura base pode inibir o crescimento das bactérias lácticas. Tramer (1973) comprovou uma diminuição da velocidade de produção de



ácido por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em leite concentrado com extrato seco total de 16,5%, quando a concentração de açúcar é incrementada de 6 a 12%. O exame microscópico dos diferentes tipos de iogurte mostrou que o *S. thermophilus* apresentou uma maior tolerância a altas concentrações de açúcar que o *L. bulgaricus* (TAMIME; ROBINSON, 1991).

3.2.4 Adição de estabilizantes

Os estabilizantes são adicionados aos leites fermentados com o objetivo de melhorar sua viscosidade e consistência e evitar a separação do soro (sinérese). Melhoram também a cremosidade, permitindo a produção de produtos com menor teor de gordura, e portanto, com menor número de calorias, mantendo sua qualidade sensorial. Os estabilizantes utilizados são hidrocolóides como a gelatina, ou carboidratos como o amido pré gelatinizado, o ágar, a goma guar, a pectina e a carragena. A gelatina ou o amido, podem ser adicionados em concentrações de até 1%, mas os outros estabilizantes devem ser adicionados na faixa de 0,3 a 0,5%, para não influir negativamente no aroma e sabor (VARNAM; SUTHERLAND, 1994; BRASIL, 2001).

Os estabilizantes, além de serem considerados produtos de grande aplicação para a manutenção e melhoria da qualidade das bebidas lácteas, são aditivos cujas fontes são naturais (FURTADO, 1997).



3.2.5 Homogeneização

Segundo Lucey e Singh (1998) durante a homogeneização do leite ocorre a dispersão dos constituintes, favorecendo as interações entre as superfícies das partículas de gordura com a matriz protéica, melhorando a consistência e reduzindo a sinérese.

A homogeneização do leite destinado à fabricação de iogurtes é feita antes do tratamento térmico e provoca um aumento na viscosidade do meio, levando a uma diminuição da sinérese devido à mudança na capacidade das proteínas em absorver água (TAMIME; ROBINSON, 1999). Durante o processo são empregadas pressões relativamente altas (15 a 20 MPa), podendo ser realizado em uma só etapa, ou em duas etapas, a segunda em pressões mais baixas, ao redor de 4 MPa (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

3.2.6 Tratamento térmico

O tratamento térmico do leite tem como objetivo principal destruir os microrganismos patogênicos para melhorar a qualidade, inativar as enzimas, melhorar a consistência e a viscosidade do produto e diminuir a sinérese (RASIC; KURMAN, 1978). Acima de 70°C as proteínas do soro sofrem desnaturação e algumas delas se associam à micela de caseína, envolvendo a κ -caseína, através de interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto intermoleculares, favorecendo as ligações cruzadas entre as partículas de caseína na rede do gel, levando ao aumento de sua rigidez (LUCEY, 2002).

Kosikowski (1978) recomenda o aquecimento do leite a 88°C por 30 minutos ou 95°C por 38 segundos. Rasic e Kurman (1978) sugerem 85°C por 30 minutos ou 90°C a 95°C por 5 a 10 minutos. Duame (1979) recomenda no mínimo 82°C e no máximo 88°C por no mínimo 30 minutos.



Davies et al. (1978) investigaram, por microscopia eletrônica, os resultados das mudanças que ocorreram no aquecimento a 95°C/10 min, e observaram a formação de apêndices filamentosos nas micelas de caseína, que pareciam ser constituídos de β -lactoglobulina desnaturada. Esses apêndices parecem inibir a coalescência, aumentando a firmeza do coágulo e diminuindo a tendência à sinérese. No entanto, em um estudo de Lucey e Sing (1998) demonstraram que o tratamento térmico severo do leite não previne a sinérese no iogurte e que, em alguns casos, o tratamento térmico pode até aumentar essa tendência.

O tratamento térmico pode estimular o início do crescimento das bactérias do fermento por redução do conteúdo de oxigênio do leite e, dependendo das condições aplicadas, pode favorecer ou inibir o desenvolvimento posterior (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

O leite pode receber o tratamento térmico em tanques, onde a mistura pode ser aquecida, resfriada e fermentada no mesmo tanque (tanque multiuso). Por este método se obtém um produto de alta qualidade, porém o ciclo de produção é extenso, a produtividade é baixa e é um processo caro tanto pelo espaço necessário como pelos custos energéticos. Muitas vezes se opta pelo tratamento contínuo, no qual o leite e o soro são aquecidos em trocadores de calor de placas ou tubulares (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

3.2.7 Processo de fermentação

Durante o processo de fermentação do leite ocorrem os seguintes fenômenos: (1) transformação da lactose em ácido láctico, conferindo o sabor ácido, abaixando o pH e levando à coagulação do leite; (2) produção de diversos compostos voláteis, sendo o acetaldeído o principal deles e (3) formação de outros compostos, tais como



exopolissacarídeos, que aumentam a viscosidade, além de ácido fólico e bacteriocinas (TAMIME; ROBINSON, 1999).

A temperatura de fermentação se dá na faixa de 40°C a 43°C, que é o intervalo médio entre as temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos do cultivo iniciador *S. thermophilus* (39°C) e *L. bulgaricus* (45°C). O cultivo iniciador é adicionado em uma proporção de aproximadamente 2%, podendo variar de 1 a 5% do volume para proporcionar uma concentração inicial entre 10^6 a 10^7 ufc/mL e é composto por quantidades aproximadamente iguais de cada um dos microrganismos (ADAMS; MOSS, 1997). Kurmann (1977), entretanto, recomenda inoculações mínimas para impedir uma acidificação intensa, como, por exemplo, 0,5 a 1% de cultura, pois a percentagem de semeadura dependerá do poder acidificante da cultura, do tempo de incubação desejado, da quantidade de células bacterianas existentes, da relação lactobacilos/estreptococos e do extrato seco do leite. Alguns fabricantes de culturas concentradas congeladas chegam a recomendar o uso de concentrações mínimas de 0,08%.

A fermentação dura aproximadamente 4 horas, durante as quais as bactérias promovem a transformação da lactose em ácido láctico. A presença deste ácido provoca a diminuição do pH de 6,3 a 6,5 para aproximadamente 4,6, ponto isoelétrico da caseína, quando as micelas se agregam para produzir um gel contínuo, no qual estão agrupados todos os componentes e onde o “dessorado” é insignificante ou nulo (ADAMS; MOSS, 1997).

Segundo Rasic e Kurmann (1978) quando cultivadas conjuntamente em leite, as linhagens de *L. bulgaricus* estimulam o crescimento do *S. thermophilus* devido à liberação de diversos aminoácidos, provenientes da caseína, sendo a valina o mais importante deles. Como consequência deste estímulo o tempo de geração das células de *S. thermophilus* é menor e, no início da fermentação, esta bactéria cresce mais rapidamente. No estágio posterior, o crescimento de *S. thermophilus* torna-se mais lento devido ao efeito adverso da

queda do pH e, nesta etapa, o número de células de *L. bulgaricus* aproxima-se gradualmente daquele de *S. thermophilus*, sendo considerada como ótima uma taxa de 1:1 ou 1:2 (*L. bulgaricus*: *S. thermophilus*). Também foi observado que quando as linhagens dessas bactérias são cultivadas conjuntamente, o tempo de coagulação é menor e a produção de acetaldeído é maior do que no caso de se cultivar cada bactéria isoladamente. A proporção de 1:10 entre as bactérias *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, na fermentação do leite, resultou em um produto com textura e aroma agradáveis.

Um dos fatores que afetam a proporção cocos/bacilos é a temperatura de incubação, como mostra a Figura 1. A 40°C a proporção é de aproximadamente 4:1 e na temperatura de 46°C, ela é 1:2. A temperatura de incubação então deve ser entre 42 e 44°C (BRANDÃO, 1997).

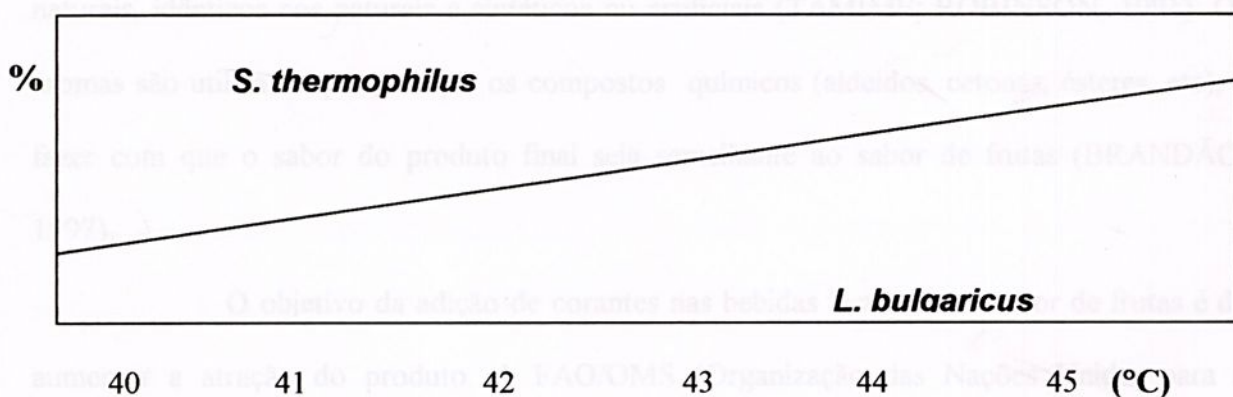


Figura 1 – Efeito da temperatura de incubação na proporção cocos/bacilos.

A proporção entre as bactérias lácticas pode ser manipulada, de acordo com as características desejadas no produto final. Observa-se uma preferência mundial e, em especial, no caso do Brasil, por um produto com sabor suave, com menos acidez.

Objetivando-se diminuir a pós-acidificação dos leites fermentados durante sua vida de prateleira e garantir um sabor suave, os fabricantes de fermentos têm aumentado o número de *S. thermophilus* em relação ao *L. bulgaricus*, de proporção inicial 1:1 ou 1:2 para 7:1 a 10:1 (ANTUNES, 2003)¹.

3.2.8 Adição de aromas, corantes e polpa de frutas

Além dos ingredientes comumente usados na mistura para a preparação de uma bebida láctea (leite, soro, açúcar, estabilizantes, entre outros), adiciona-se também aromas, corantes e base de frutas (ou outros alimentos), para produção de sabor característico específico (BRANDÃO, 1997).

Os aromatizantes são classificados, em função de sua origem, em três grupos: naturais, idênticos aos naturais e sintéticos ou artificiais (TAMIME; ROBINSON, 1991). Os aromas são utilizados para realçar os compostos químicos (aldeídos, cetonas, ésteres, etc), e fazer com que o sabor do produto final seja semelhante ao sabor de frutas (BRANDÃO, 1997).

O objetivo da adição de corantes nas bebidas lácteas com sabor de frutas é de aumentar a atração do produto. A FAO/OMS (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde) têm estabelecido algumas orientações sobre os corantes e as concentrações que podem ser utilizados no iogurte (TAMIME; ROBINSON, 1991).

Pode-se utilizar frutas frescas nas bebidas lácteas, porém o caráter sazonal de produção das mesmas e a variabilidade de sua qualidade limita consideravelmente sua utilização pelas indústrias, sendo mais populares as conservas de frutas, especialmente

¹ ANTUNES, L. A. F. (Chr-Hansen, Valinhos). Comunicação Pessoal, 2003.



pela possibilidade de padronizar a mistura de frutas com o objetivo de satisfazer as especificações desejadas pelos consumidores (TAMIME; DEETH, 1980).

A adição desses produtos é permitida para contribuir com a manutenção de sua qualidade durante a estocagem. Os ácidos orgânicos (cítrico, láctico, etc) são utilizados para reduzir o pH. Os conservantes (até 0,5% de ácido sórbico) previnem o crescimento de fungos e leveduras (BRANDÃO, 1997; BRASIL, 2000).

3.2.9 Resfriamento, envase e estocagem

Como a elaboração de um produto fermentado envolve um processo biológico, é necessário o uso da refrigeração para controlar a atividade metabólica dos microrganismos e suas enzimas. O objetivo do resfriamento é diminuir a temperatura do coágulo de 45°C, aproximadamente, para menos de 10°C tão rapidamente quanto seja possível (TAMIME; ROBINSON, 1991; BRANDÃO, 1995). O resfriamento continua até o produto atingir temperaturas inferiores a 5°C. Nessas temperaturas o produto se conserva durante um período de aproximadamente três semanas (Figura 2). Durante o armazenamento a acidez seguirá aumentando lentamente (ADAMS; MOSS, 1997).



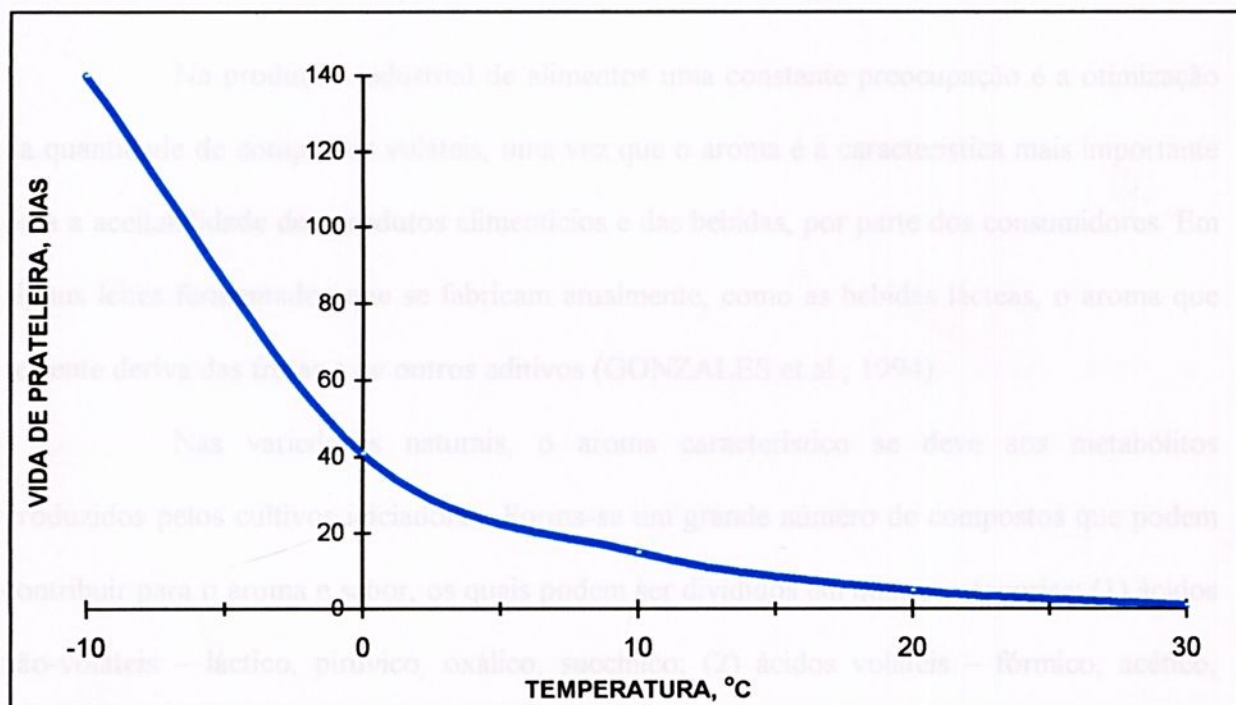


Figura 2 – Vida de prateleira das bebidas lácteas em função da temperatura de estocagem.

A produção de ácido do *S. thermophilus* é inibida em pH 3,9 a 4,3 e do *L. bulgaricus* em pH 3,5 a 3,8. Portanto, os *L. bulgaricus* são os que mais contribuem para a acidificação em valores de pH menores que 4,0. Em valores de pH superiores a 4,0, tanto *S. thermophilus* quanto *L. bulgaricus* contribuem para a pós-acidificação do produto. A intensidade da pós-acidificação em iogurtes depende da capacidade de acidificação das culturas, da etapa de fermentação nos tanques, do resfriamento, da temperatura de armazenamento e do valor inicial de pH (RASIC; KURMAN, 1978).

3.3 O aroma dos leites fermentados

Na produção industrial de alimentos uma constante preocupação é a otimização da quantidade de compostos voláteis, uma vez que o aroma é a característica mais importante para a aceitabilidade dos produtos alimentícios e das bebidas, por parte dos consumidores. Em alguns leites fermentados que se fabricam atualmente, como as bebidas lácteas, o aroma que se sente deriva das frutas e de outros aditivos (GONZALES et al., 1994).

Nas variedades naturais, o aroma característico se deve aos metabólitos produzidos pelos cultivos iniciadores. Forma-se um grande número de compostos que podem contribuir para o aroma e sabor, os quais podem ser divididos em quatro categorias: (1) ácidos não-voláteis – láctico, pirúvico, oxálico, succínico; (2) ácidos voláteis – fórmico, acético, propiônico, butírico; (3) compostos carbonílicos – acetaldeído, acetona, acetoína ou diacetil e (4) compostos diversos como aminoácidos e/ou constituintes formados pela degradação térmica (pasteurização) de proteína, lactose ou gordura. O ácido láctico é o principal componente do sabor dos leites fermentados e a sua quantidade determina a aceitabilidade do produto, e se produzido em excesso, altera o sabor do produto. Apesar de mais de 100 compostos químicos terem sido identificados em leites fermentados, o acetaldeído e o diacetil, causam impacto significativo no sabor desejado, e estão presentes em quantidades detectáveis por técnicas tradicionais (TAMIME; ROBINSON, 1999).

Acredita-se que o acetaldeído seja o principal responsável pelo aroma característico dos leites fermentados. Em análises sensoriais para avaliação do aroma, o acetaldeído é o responsável pela nota “fruta-fresca”; esta associação deve-se, provavelmente, à formação de acetaldeído no amadurecimento das frutas (TAMIME; ROBINSON, 1999). Nos leites fermentados encontram-se altas concentrações de acetaldeído, provavelmente,



porque as bactérias lácticas presentes no fermento não possuem a enzima álcool desidrogenase, responsável pela conversão de acetaldeído em etanol (LEES; JAGO, 1978).

Apesar da importância dos compostos acetaldeído e diacetil em leites fermentados já estar bem estabelecida, é muito difícil avaliar a contribuição destes diversos compostos voláteis, uma vez que o seu limite de detecção sensorial varia consideravelmente (DUMONT; ADDA, 1973).

Na literatura, os estudos sensoriais indicam divergências entre os pesquisadores quanto à quantidade de acetaldeído necessário nos leites fermentados. Rohm, Kovac, Kneifel, (1994) encontraram uma correlação positiva entre sabor e acidez com a produção de ácido láctico e de acetaldeído. Kneifel, Jaros e Erhard (1993) identificaram o acetaldeído como o mais proeminente participante no sabor típico desses produtos; os painéis sensoriais classificaram leites fermentados que continham menos de 10 ppm de acetaldeído, como tendo um “sabor fraco”; estas amostras também apresentaram pouca acidez. A partir destes resultados eles concluíram que, o acetaldeído é um importante composto nesse tipo de produto, porém, tanto a acidez quanto os produtos de degradação de proteínas também influenciam o seu sabor.

Bottazzi e Vescovo (1969) avaliando a produção de acetaldeído em diferentes culturas lácticas, constataram que as que produziram cerca de 8 ppm resultaram em um produto com sabor muito agradável; as que produziram por volta de 4 ppm não apresentaram um sabor completo, e nas que apresentaram produção de acetaldeído inferior a 1 ppm, o sabor do produto foi classificado como inadequado. A concentração ideal de acetaldeído para que o produto tenha o seu sabor típico varia de 10 a 15 ppm. Os níveis de acetaldeído em produtos fermentados variam consideravelmente e um defeito comumente julgado pelos painéis sensoriais é a falta do sabor característico do produto (SCHMIDT; DAVIDSON; BATES, 1983).



Apesar do aroma ser avaliado pela análise sensorial, por uma equipe treinada ou por testes de preferências (consumidores), os métodos químicos são bastante utilizados e, dentre eles, a cromatografia gasosa tem se destacado e vem sendo muito utilizada para a detecção e quantificação de compostos voláteis em diversos produtos lácteos (ULBERTH, 1991), como por exemplo, as bebidas lácteas.

3.3.1 Produção de acetaldeído

O acetaldeído é produzido por quase todos os microrganismos e está envolvido no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e compostos aromáticos, para os quais fornece um mecanismo de troca de carbono entre eles (LEES; JAGO, 1978).

Em produtos lácteos fermentados, o acetaldeído é produzido pelas bactérias lácticas, verificando-se um efeito sinérgico quando os microrganismos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são cultivados conjuntamente (Figura 3). Ele é produzido em quantidade significativa, em comparação com os demais compostos voláteis, e sua taxa de produção está relacionada com a acidez do meio iniciando-se quando o pH encontra-se ao redor de 5, em seguida aumenta rapidamente até a solução atingir um pH de 4,4 a 4,3, e a partir deste ponto, a produção de acetaldeído diminui, sendo estabilizada em pH 4,0 (CHAVES, 2002).

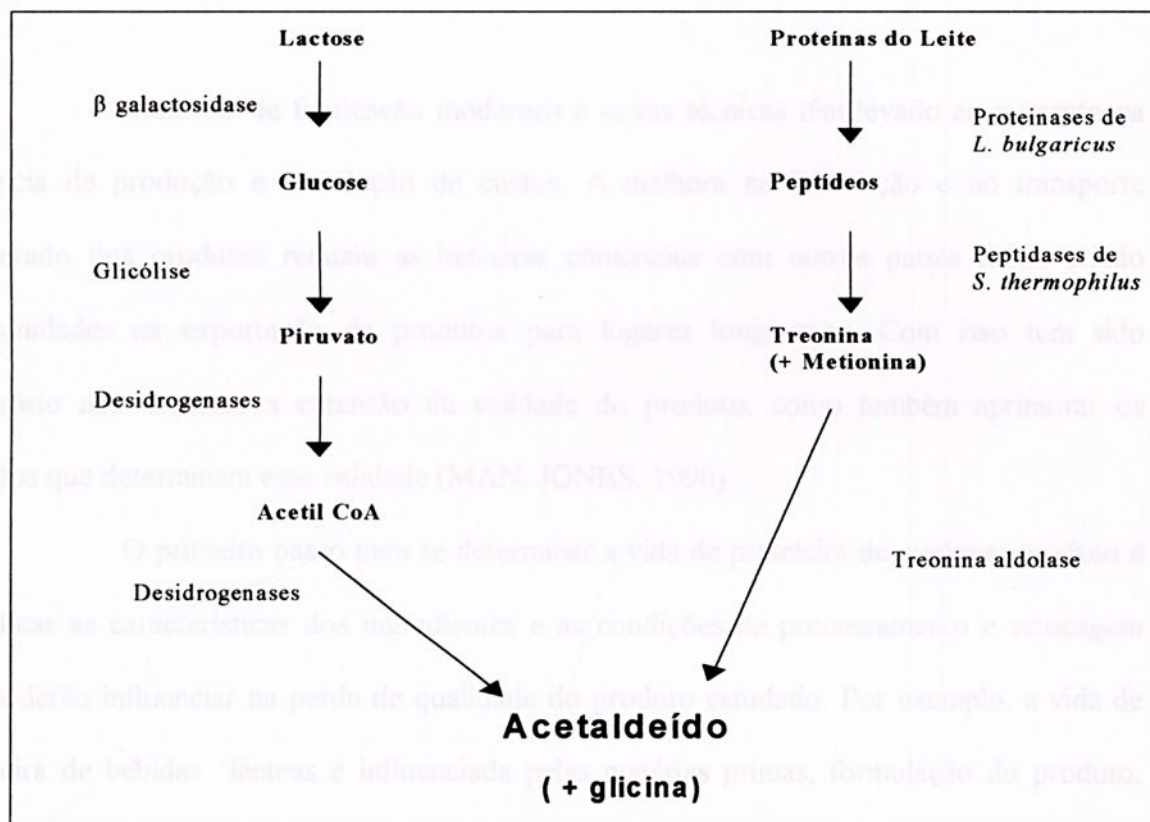


Figura 3 – Produção de acetaldeído por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*

Durante o armazenamento podem ocorrer perdas de acetaldeído, principalmente se o produto possuir pouca quantidade de gordura. O tipo de leite utilizado na fabricação do produto também afeta a sua produção, sendo os maiores níveis observados com o leite de vaca e os menores com leite de ovelha, devido a alguns produtos da degradação da caseína, presente no leite de vaca, serem mais utilizados pelas bactérias lácticas para a produção do acetaldeído (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

3.4 Vida de prateleira

Métodos de fabricação modernos e novas técnicas têm levado ao aumento na eficiência de produção e à redução de custos. A melhora na fabricação e no transporte refrigerado dos produtos reduziu as barreiras comerciais com outros países tendo criado oportunidades na exportação de produtos para lugares longínquos. Com isso tem sido necessário não somente a extensão da validade do produto, como também aprimorar os métodos que determinam essa validade (MAN; JONES, 1996).

O primeiro passo para se determinar a vida de prateleira de qualquer produto é identificar as características dos ingredientes e as condições de processamento e estocagem que poderão influenciar na perda de qualidade do produto estudado. Por exemplo, a vida de prateleira de bebidas lácteas é influenciada pelas matérias primas, formulação do produto, parâmetros de processo, implementação de boas práticas de produção, embalagem, armazenamento e distribuição e modo de consumo (SIVIERI, 2002).

3.4.1 Reações de transformação e cinética

Mesmo os melhores processos de conservação de alimentos não conseguem evitar que ocorram certas transformações nos mesmos em função do tempo. Essas reações dependem de uma série de fatores, tais como temperatura, concentração de reagentes, umidade relativa, presença de catalisadores ou inibidores, etc, (CABRAL; FERNANDES, 1980).

Geralmente, a velocidade das transformações em alimentos aumenta com o aumento da temperatura; contudo, conforme a faixa de temperatura estudada, os mecanismos ou mesmo o tipo de transformação podem mudar completamente. A representação do efeito

da temperatura nessas transformações pode ser feita sob várias formas (TEIXEIRA NETO et al., 1993).

A forma universalmente aceita é, no entanto, aquela dada pela equação de Arrhenius:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

$$\text{ou} \quad \ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

onde

k = constante de velocidade

A = fator de frequência

T = temperatura absoluta

E_a = energia de ativação

R = constante dos gases

Nos testes acelerados de vida de prateleira trabalha-se, comumente, com variações de temperatura e/ou umidade, que são elevadas em relação ao padrão normal, acelerando as reações. É preciso, contudo, saber que este processo pode resultar em conclusões erradas, porque conforme a faixa de temperatura estudada, os mecanismos ou mesmo o tipo de transformação podem mudar completamente, ou seja, uma reação que não era tão importante numa determinada temperatura passa a ser preponderante numa temperatura mais elevada. Isto significa que os resultados dos testes acelerados de vida de prateleira devem sempre ser confirmados por observações em situações próximas de conservação normal do alimento (CABRAL; FERNANDES, 1980).

A Figura 4 ilustra esse tipo de limitação dos testes acelerados. Nela estão hipoteticamente representados 3 tipos de reações diferentes (A, B e C) identificadas em um determinado alimento. Nota-se que B e C possuem a mesma inclinação, o que significa possuírem a mesma energia de ativação, embora B sempre apresente uma velocidade de

reação maior que C a uma mesma temperatura, indicando com isso, que a reação de B será sempre mais importante do que a de C para a estimativa de vida de prateleira. No entanto, quando se compara B e A verifica-se que elas possuem energias de ativação diferentes, existindo entre elas um ponto comum de temperatura (T_c) onde as velocidades de reação de B superam as de A, mas para temperaturas menores que T_c (ou $1/T$ maiores) isto se inverte e as velocidades de reação de A superam as de B. Portanto, se num teste acelerado, para o alimento desse exemplo fosse utilizada uma temperatura T_a , a reação de deterioração predominante seria a reação B e seria estimado um valor de vida de prateleira à temperatura normal de estocagem T e inadequado, pois como se vê na figura, nesta temperatura, a velocidade da reação A é bem maior do que a reação B, logo o alimento se deterioraria mais rápido do que o calculado baseado no teste acelerado (TEIXEIRA NETO et al., 1993).

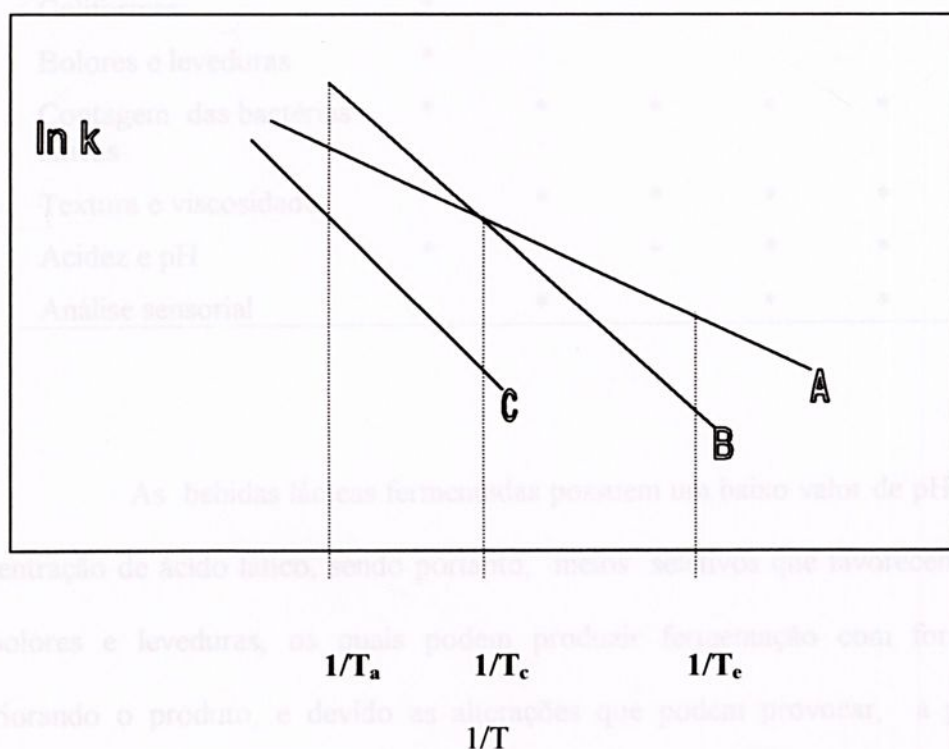


Figura 4 – Representação esquemática de três reações diferentes em função da temperatura.

3.5 Determinação da vida de prateleira de bebidas lácteas

Os fatores importantes a considerar na determinação da vida de prateleira de uma bebida láctea são o período de validade desejada, a temperatura de estocagem e de distribuição, a possível contaminação por bolores e leveduras e a manutenção do número de bactérias lácticas. Alterações físicas como sinérese, textura e alteração do aroma e da cor devem ser checadas em intervalos regulares dentro do tempo de validade estimado e além dele. A Tabela 1 mostra as análises para a determinação da vida de prateleira de produtos lácteos fermentados propostos por Man e Jones (1996).

Tabela 1 – Avaliações durante a vida de prateleira dos leites fermentados.

Número de dias	0	1	7	14	21	28
Coliformes	*					
Bolores e leveduras	*					*
Contagem das bactérias lácticas	*	*	*	*	*	*
Textura e viscosidade		*	*	*	*	*
Acidez e pH	*	*	*	*	*	*
Análise sensorial		*	*	*	*	*

As bebidas lácteas fermentadas possuem um baixo valor de pH e uma elevada concentração de ácido láctico, sendo portanto, meios seletivos que favorecem o crescimento de bolores e leveduras, os quais podem produzir fermentação com formação de gás, deteriorando o produto, e devido as alterações que podem provocar, a presença desses microrganismos é investigada no início e no final da vida de prateleira. Outros fatores, como por exemplo, a acidificação insuficiente devido a presença de antibióticos e a qualidade da matéria-prima usada, podem influenciar na qualidade do produto (WALSTRA et al., 1999).

4.1.3.3. As bactérias láticas do fermento permanecem no produto em um número superior a 10^8 ufc/g durante longos períodos de tempo, em temperaturas inferiores a 10°C , porém esse número diminui rapidamente, em temperaturas mais elevadas, pelo aumento do metabolismo desses microrganismos após a fermentação, reduzindo a vida útil da bebida pelo excesso de acidez e pela atividade proteolítica dessas bactérias, causando sabor amargo e diminuindo a textura e viscosidade do produto, sendo portanto importante a manutenção do número das bactérias láticas durante a vida de prateleira (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

- cultura tradicional para iogurte composta de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Christian Hansen);
- açúcar;
- aroma natural sabor morango (Doms Rodas);
- polpa de fruta sabor morango (Maribo);
- corante natural de carmim de cochonilha 3% (Christian Hansen).

4.2 Equipamentos

- pHmetro digital (Digimed);
- acidímetro (Gerber);
- autoclave (Fabbe);
- cronômetro digital modelo MK 540 (TTR);
- balança analítica de precisão (Ohaus);
- termolactodensímetro (Mettler);
- estufa a vácuo modelo MIA 030 (Marconi Equipamentos);
- estufa de esterilização e conservação (F-2000);
- forno Mufla $100-1200^\circ\text{C}$ (Quimis).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

- leite padronizado a 3,2% de matéria gorda;
- soro de leite líquido obtido do processo de fabricação do queijo minas frescal;
- espessante SBB 280, composto por uma mistura de amido e gelatina (Danisco Cultor);
- cultura tradicional para iogurte composta de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Christian Hansen);
- sacarose;
- aroma natural sabor morango (Duas Rodas);
- polpa de fruta sabor morango (Maribo);
- corante natural de carmin de cochonilha 3% (Christian Hansen).

4.2 Equipamentos

- pHmetro digital (Digimed);
- acidímetro (Gerber);
- autoclave (Fabbe);
- crioscópio digital modelo MK 540 (ITR);
- balança analítica de precisão (Ohaus);
- termolactodensímetro (Mercúrio);
- estufa a vácuo modelo MA 030 (Marconi Equipamentos);
- estufa de esterilização e secagem (Fanem);
- forno Mufla 100-1200°C (Quimis);



- cromatógrafo gasoso HP – 5890 Séries II; equipado com detector de ionização de chama;
- coluna capilar de polietilenoglicol (25 m/02mm/03 μ m);
- Banho-Maria MA 120 (Marconi);
- destilador de nitrogênio MA 036 e bloco digestor (Marconi Equipamentos);
- geladeira à 8°C (Cônsul);
- vidrarias básicas de laboratório.

4.3 Reagentes e meios de cultura

- água peptonada 0,1%;
- solução aquosa de hidróxido de sódio 0,11 mol/L (Tec Lab);
- fenolftaleína 1% (m/v) (Tec Lab);
- ácido sulfúrico d = 1825 g/L (Synth);
- álcool amílico PA d = 815 g/L (Tec Lab);
- catalisador (mistura de 96% de K₂SO₄ + 4% de CuSO₄);
- ácido sulfúrico concentrado 95-98% de pureza (Synth);
- solução aquosa de hidróxido de sódio 40% (m/v);
- solução de ácido bórico a 2% (m/v);
- solução de ácido clorídrico 0,05 mol/L;
- ácido tricloroacético 12% (m/v);
- meio de cultura ágar M 17;
- meio de cultura ágar MRS-acidificado;
- PetrifimTM para contagem de coliformes (3M Microbiology, St. Paul, MMM, EUA);



- Petrifilm™ para contagem de bolores e leveduras (3M Microbiology, St.Paul, MMM, EUA).

4.4 Procedimento experimental para a obtenção da bebida láctea

Para a produção da bebida láctea utilizou-se uma mistura de volumes iguais de leite pasteurizado padronizado a 3,2% de matéria gorda e de soro de leite pasteurizado, à qual adicionou-se sacarose (correspondente a 10% m/v) e estabilizante (0,3%), composto por uma mistura de amido e gelatina. A mistura foi aquecida a 85°C por 20 minutos e, em seguida, resfriada até 42°C para a adição da cultura láctea (0,5%), composta pelas bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, e incubada a essa temperatura. A fermentação foi interrompida quando o pH chegou a valores próximos de 4,8, deixando-se resfriar até 20°C. O coágulo formado foi quebrado por agitação mecânica, e foram adicionados o aromatizante sabor morango (0,1%), a polpa de morango (0,3%) e o corante natural carmim de cochonilha (0,05%) para produção do sabor e cor característicos. Em seguida a bebida foi resfriada a 5 °C e embalada em frascos plásticos de polietileno, como apresentado na Figura 5. A bebida foi preparada duas vezes, constituindo os blocos 1 e 2. Em cada bloco as amostras foram divididas em dois lotes, sendo no bloco 1 armazenados a 7°C e 37°C e no bloco 2 a 7°C e 25°C. Escolheu-se a temperatura de 7°C por ser a mais utilizada para a conservação desse tipo de produto, e para acelerar as possíveis reações químicas, optou-se pela estocagem a 25°C e 37°C.

Figura 5 - Fluxograma de processamento da bebida láctea.

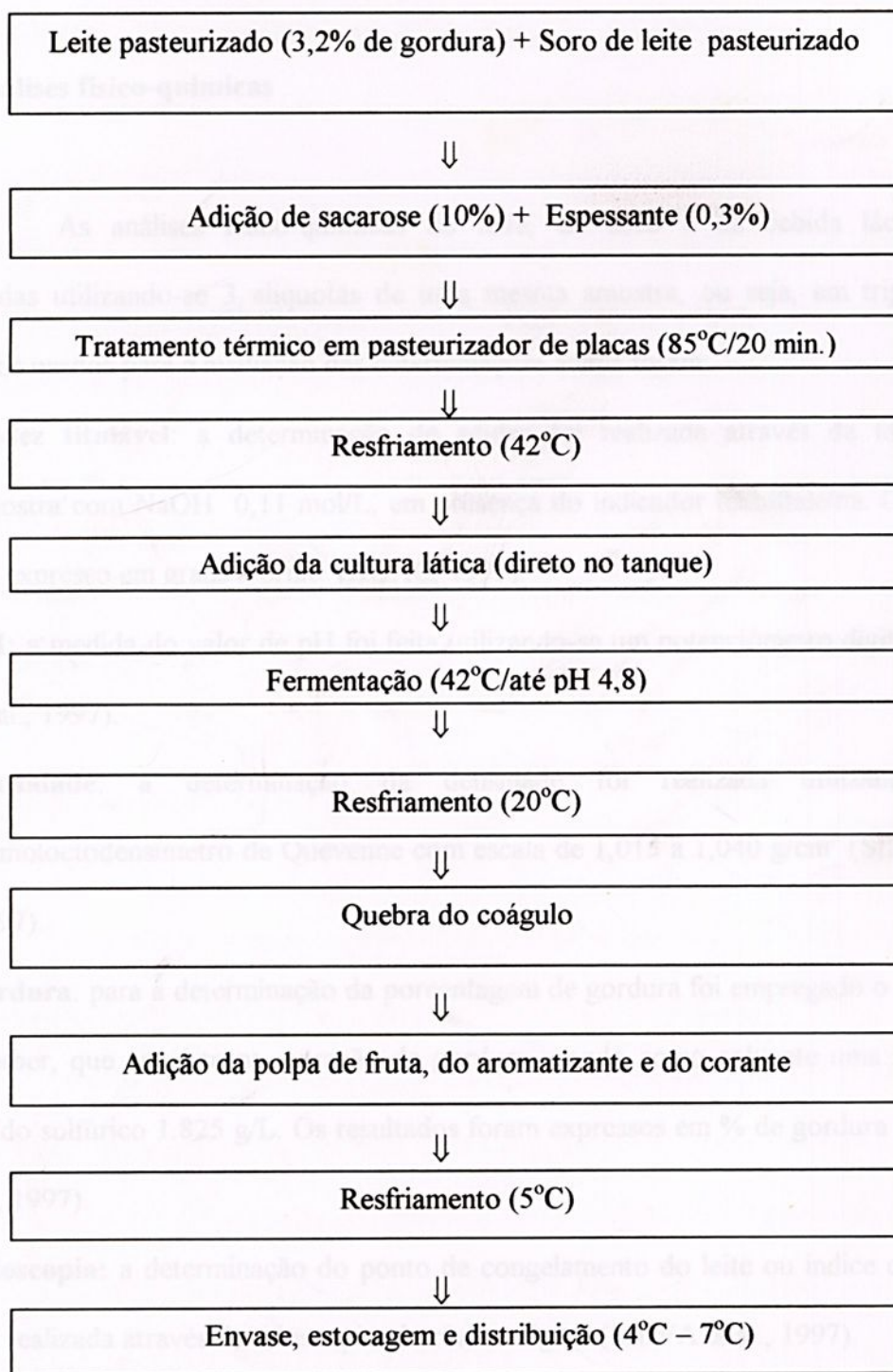


Figura 5 - Fluxograma do processamento da bebida láctea.

4.5 Métodos

4.5.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas do leite, do soro e da bebida láctea foram realizadas utilizando-se 3 alíquotas de uma mesma amostra, ou seja, em triplicata. Os métodos usados para a avaliação das determinações acima foram:

- **acidez titulável:** a determinação de acidez foi realizada através da titulação da amostra com NaOH 0,11 mol/L, em presença do indicador fenolftaleína. O resultado foi expresso em graus Dornic (AOAC, 1995).
- **pH:** a medida do valor de pH foi feita utilizando-se um potenciômetro digital (SILVA et al., 1997).
- **densidade:** a determinação da densidade foi realizada utilizando-se um termolactodensímetro de Quevenne com escala de 1,015 a 1,040 g/cm³ (SILVA et al., 1997).
- **gordura:** para a determinação da porcentagem de gordura foi empregado o método de Gerber, que consiste na extração da gordura usando como solvente uma solução de ácido sulfúrico 1.825 g/L. Os resultados foram expressos em % de gordura (SILVA et al., 1997).
- **crioscopia:** a determinação do ponto de congelamento do leite ou índice crioscópico foi realizada através de crioscópio eletrônico digital (SILVA et al., 1997).
- **antibióticos:** a presença de resíduos de antibióticos do grupo β -lactâmicos foi verificada através do teste SNAP (TRONCO, 1997).



- **sólidos totais:** o teor de sólidos totais foi determinado pela secagem da amostra a 70°C até peso constante em estufa a vácuo, conforme indicado pela American Public Health Association – APHA (CASE; BRADLEY; WILLIAMS, 1985).
- **cinzas:** a determinação do teor de cinzas foi realizada por incineração em forno mufla a 550°C (AOAC, 1995).
- **proteínas:** a análise foi realizada baseando-se na determinação de nitrogênio, pelo método de micro-Kjeldahl (SILVA et.al, 1997). O fator de conversão de nitrogênio em proteína é 6,38, ou seja: % de proteína = 6,38 x % de Nitrogênio
- **nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA 12%):** a determinação desta análise foi realizada pelo método micro-Kjeldahl (SILVA et al., 1997).
- **nitrogênio solúvel em pH 4,6:** a análise foi determinada pelo método micro-Kjeldahl (SILVA et al., 1997).

4.5.3 Análises sensoriais

4.5.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas utilizando-se 2 alíquotas de uma mesma amostra, ou seja, em duplicata, as quais foram diluídas para 10^{-1} .

Para a pesquisa de coliformes utilizou-se Petrifilm™ *E. coli* Count Plate (3M Microbiology). Após um dia de fabricação, alíquotas de 1,0 mL da bebida láctea diluída (25 mL da amostra + 225 mL de água peptonada) foram transferidas para placas de Petrifilm de acordo com as instruções do fabricante, deixando-se incubar por 48 horas a 35°C. Para a pesquisa de bolores e leveduras foram utilizadas placas de Petrifilm™, e as alíquotas foram incubadas por 5 dias a 25°C (FRANCO; LANDGRAF; DESTRO, 1996). Essas análises foram realizadas no 1º e no 35º dia de estocagem.



A viabilidade das bactérias lácticas foi determinada por meio de contagem em placas. Uma alíquota de 25,0 mL da amostra foi transferida para um Erlenmeyer contendo 225 mL de solução de água peptonada estéril 0,1%. A partir desta solução foram feitas as diluições subseqüentes, e alíquotas de 1,0 mL de cada solução diluída foram transferidas para as placas de Petri estéreis e, em seguida, adicionou-se os meios de cultura (inoculação por profundidade). Após o tempo de incubação necessário para cada meio de cultura, a contagem foi realizada nas placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias.

Para a contagem de *Streptococcus thermophilus* utilizou-se ágar M 17, incubado a 37°C por 48 horas em aerobiose e, para o *Lactobacillus bulgaricus*, utilizou-se o ágar MRS acidificado (pH 5,4), incubado a 37°C por 72 horas, em anaerobiose (IDF, 1997). Essas análises foram realizadas semanalmente, a partir do primeiro dia de armazenamento.

4.5.3 Análise sensorial

Para a verificação da aceitação da bebida láctea fermentada foram avaliados alguns atributos considerados importantes para o caso das bebidas lácteas fermentadas, através dos testes de análise sensorial, “consistência” e “sabor e aroma” usando-se a escala do ideal de 7 pontos; e “aceitação global”, usando-se a escala hedônica de 9 pontos. Empregou-se um painel de 25 provadores, com uma frequência de consumo de leites fermentados variada: 7% consomem todos os dias, 23% uma vez por semana, 26% a cada 15 dias e 44% uma vez por mês. Todas as análises foram realizadas duas horas após o almoço.

O modelo de ficha utilizado para avaliar a aceitabilidade dos produtos está apresentado na Figura 6 (PEREIRA, 2002).

**FICHA PARA AVALIAÇÃO DA ACEITABILIDADE DA BEBIDA LÁCTEA HAPPY FRUTY
“SABOR MORANGO”**

NOME _____

DATA _____

Você consome bebida láctea

() todos os dias
() uma vez por semana
() a cada 15 dias
() uma vez por mês

1 – Como você avalia a “consistência” em relação ao que você gosta?

7 - muito mais consistente do que eu gosto

6

5

4 - está do jeito que eu gosto

Valor da escala _____

3

2

1 - muito menos consistente do que eu gosto

2 – Como você avalia o “sabor e aroma” do produto em relação ao que você gosta?

7 – muito mais ácido do que eu gosto

6

5

4 – está do jeito que eu gosto

Valor da escala _____

3

2

1 – muito menos ácido do que eu gosto

3 – Dê uma nota que indique o quanto você gostou ou desgostou do produto como um todo usando a escala abaixo:

9 – gostei extremamente

8

7 – gostei moderadamente

6

5 – nem gostei/nem desgostei

Valor da escala _____

4

3 – desgostei moderadamente

2

1 – desgostei extremamente

Figura 6 – Ficha utilizada para avaliação de aceitabilidade da bebida láctea.



4.5.4 Análise cromatográfica de alguns compostos voláteis

Todas as análises foram efetuadas no cromatógrafo a gás HP – 5890 Séries II, com injetor “split-splitless” e um detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada uma coluna capilar de polietilenoglicol FFAP (25 m x 02 mm x 03 µm).

Para a determinação dos compostos químicos voláteis presentes na bebida utilizou-se o método da padronização interna, que consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância padrão na amostra a ser analisada, e relacionar as áreas obtidas para cada componente de interesse da mistura com a área da substância padrão (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1990). No preparo da amostra adicionou-se 0,5 mL de álcool amílico 0,1% (substância padrão) em 4,5 mL da bebida a ser analisada.

$$\text{EX: razão de áreas} = \frac{\% \text{ Área substância observada}}{\% \text{ Área substância conhecida}}$$

O acompanhamento da quantidade de compostos voláteis foi feito semanalmente, durante 35 dias de armazenamento da bebida láctea. Uma alíquota de 5,0 mL da amostra foi transferida para um frasco de vidro de 10 mL com tampa de borracha, o qual foi mantido em banho-maria, numa temperatura de 50°C por 10 minutos, sob agitação constante. Em seguida coletou-se, com uma seringa, uma alíquota da mistura dos gases voláteis existentes entre a superfície líquida e a tampa de borracha, e procedeu-se a injeção no cromatógrafo gasoso (ULBERTH, 1991).

A temperatura inicial do forno do cromatógrafo foi de 35°C por 4 minutos com incremento de 6°C/min até 150°C, na qual permaneceu por 1 minuto. A temperatura do injetor foi de 200°C e do detector 250°C. A pressão na cabeça da coluna foi de 105 KPa e a razão de Split foi de 11,5. As análises cromatográficas foram realizadas em duplicatas.



4.5.5 Análise estatística

A significância dos resultados das amostras foi testada pela análise de variância (ANOVA) com a utilização do teste de Tukey, através do programa ESTAT, desenvolvido por Banzato e Kronka (1995). Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.



T.1319/05

5.1 Caracterização do leite e do soro de leite

A qualidade do leite pode ser evidenciada por meio de determinações físico-químicas. Assim, através de exames quantitativos, é possível identificar a adição de substâncias adulterantes, a eventual presença de conservantes e até fazer o cálculo aproximado do rendimento industrial (SIVIERI, 2002).

Os resultados das avaliações físico-químicas do leite e do soro, utilizados na elaboração da bebida láctea, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão das análises do leite pasteurizado utilizado na elaboração da bebida láctea.

Análises	Bloco 1	Bloco 2
pH	6,9 ± 0,0	6,8 ± 0,0
Acidez (°D)	15,5 ± 0,0	16,0 ± 0,0
Densidade (g/cm ³)	1,033 ± 0,015	1,032 ± 0,120
Gordura (%)	3,5 ± 0,0	3,4 ± 0,0
Extrato seco total (%)	12,43 ± 0,05	12,22 ± 0,05
Extrato seco desengordurado (%)	8,93 ± 0,02	8,22 ± 0,05
Crioscopia (°H)	-0,544 ± 0,002	-0,535 ± 0,008
Antibiótico	Negativo	Negativo

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado em dois blocos: inicialmente, foi elaborada e analisada a bebida do bloco 1 e, posteriormente à avaliação dos resultados obtidos neste primeiro bloco, foi preparada e analisada a bebida do bloco 2.

Nos dois blocos foram efetuadas a caracterização físico-química do leite e do soro utilizados na fabricação, bem como a caracterização físico-química, microbiológica, sensorial e cromatográfica das bebidas.

5.1 Caracterização do leite e do soro de leite

A qualidade do leite pode ser evidenciada por meio de determinações físico-químicas. Assim, através de exames quantitativos, é possível identificar a adição de substâncias adulterantes, a eventual presença de conservantes e até fazer o cálculo aproximado do rendimento industrial (SIVIERI, 2002).

Os resultados das avaliações físico-químicas do leite e do soro, utilizados na elaboração da bebida láctea, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão das análises do leite pasteurizado utilizado na elaboração da bebida láctea.

Análises	Bloco 1	Bloco 2
pH	6,9 ± 0,0	6,8 ± 0,0
Acidez (°D)	15,5 ± 0,0	16,0 ± 0,0
Densidade (g/cm ³)	1,033 ± 0,015	1,032 ± 0,120
Gordura (%)	3,5 ± 0,0	3,4 ± 0,0
Extrato seco total (%)	12,43 ± 0,05	12,22 ± 0,05
Extrato seco desengordurado (%)	8,93 ± 0,02	8,82 ± 0,05
Crioscopia (°H)	- 0,544 ± 0,002	- 0,535 ± 0,008
Antibiótico	Negativo	Negativo



Os valores numéricos apresentados na Tabela 2 estão de acordo com os requisitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51: valor de pH 6,6-6,8; acidez 15,0°D-18,0°D; densidade 1,031 g/cm³-1,033 g/cm³, gordura 3,3%-3,6%; extrato seco total, acima de 11,5%; extrato seco desengordurado, acima de 8,5%; crioscopia - 0,530°H a - 0,550°H (BEHMER, 1987; BRASIL, 2002); sendo portanto esta matéria prima adequada para a elaboração da bebida láctea .

O soro pode ser considerado “doce” quando apresenta valor de pH entre 5,8 a 6,6 e teor de acidez de 10 a 20° D. A composição do soro pode variar em função do processo de fabricação e do tipo de queijo a ser fabricado. De maneira geral, o soro doce é composto por 93 a 94% de água, 4,5 a 5,0% de lactose, 0,8 a 1,0% de cinzas e 0,1 a 0,5% de gordura (SIVIERI, 2002).

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das análises do soro de leite utilizado na elaboração da bebida láctea.

Análises	Bloco 1	Bloco 2
pH	6,6 ± 0,0	6,8 ± 0,0
Acidez (°D)	10,5 ± 0,0	10,0 ± 0,0
Densidade (g/cm ³)	1,024 ± 0,001	1,026 ± 0,000
Gordura (%)	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Extrato seco total (%)	6,97 ± 0,24	6,50 ± 0,09

Os resultados apresentados na Tabela 3 são semelhantes aos encontrados na literatura, e neste caso, também o soro utilizado está dentro das especificações esperadas.

Penna (1997) analisou soros de leite para elaboração de bebidas lácteas sendo que os valores encontrados foram: densidade 1,027 g/cm³, teor de acidez 9,18°D, valor de pH 6,43, teor de gordura 1,5% e teor de sólidos totais 6,29%. Neste trabalho foram encontrados valores semelhantes nas análises de acidez, pH e sólidos totais, porém os valores de teor de

gordura não foram próximos. As variações observadas podem estar relacionadas ao tratamento térmico do leite, ao tipo de coagulação (ácida ou enzimática), ao corte ou ao tratamento da massa, que podem levar a uma maior ou menor perda de componentes do leite ou da coalhada para o soro, alterando assim a sua composição (OLIVEIRA; BRANDÃO, 2002).

5.2 Caracterização físico-química da bebida láctea

A caracterização físico-química da bebida láctea, foi feita através das avaliações de: temperatura de estocagem, pH, acidez, gordura, cinzas, sólidos totais, proteína total, nitrogênio não caseico e nitrogênio não protéico.

Os valores médios e desvio padrão das análises descritas acima, dos blocos 1 e 2, estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

O valor mais elevado da temperatura no 1º dia ocorreu devido ao envase do produto não ter sido feito em câmara refrigerada. A temperatura tornou-se constante após um tempo de acomodação dentro da câmara fria.

No produto estocado a 7°C, nos dois blocos avaliados, o valor de pH sofreu maior variação, de 4,5 para 4,2, nos primeiros 7 dias e depois permaneceu estável, em 4,1, até o 35º dia. A acidez variou de 59ºD para 63ºD, na primeira semana, ficando estável, em 63ºD, no período restante da estocagem. Os valores de pH obtidos na temperatura de estocagem de 7°C, estão de acordo com os encontrados por Sivieri e Oliveira (2002), que variaram de 4,0 a 4,6 nas bebidas lácteas fermentadas logo após a fabricação. Santos e Ferreira (2001) encontraram valores de acidez próximos de 70ºD para uma bebida láctea fermentada formulada com 30% de soro.

A análise de variância demonstrou que, a 7°C, houve diferença significativa, nos valores médios de pH e de acidez titulável; e os valores médios dos teores de gordura, cinzas, sólidos totais e proteínas totais não apresentaram diferenças significativas. O aumento das frações de nitrogênio não caseico e não protéico, embora apresentaram variações significativas nessa temperatura, foi pequeno, como mostram os resultados do Teste de Tukey nas Tabelas 4 e 5, o que não se traduz como um aumento importante, se comparado com os aumentos das mesmas frações, em temperaturas de estocagem mais elevadas.

Na bebida mantida a 25°D, o valor de pH apresentou queda de 4,5 para 4,1 e a acidez aumentou de 59°D para 70°D, nos primeiros 7 dias, e no 28° dia o valor de pH diminuiu para 3,9 e a acidez aumentou para 90°D, permanecendo nesses valores até o 35° dia. Também variaram as frações de nitrogênio não caseico e não protéico que, no 35° dia de armazenamento alcançaram, respectivamente, valores 40 e 42% maiores que os encontrados no início da estocagem, devido provavelmente ao aumento da atividade proteolítica das bactérias lácticas nessa temperatura, causando sabor amargo ao produto.

Através da análise de variância dos resultados, apresentados na Tabela 5, ficou demonstrado que o tempo de estocagem afetou significativamente os valores de pH, acidez, nitrogênio não caseico e nitrogênio não protéico da bebida láctea, quando a mesma foi estocada a 25°C.

À 37°C os valores de pH variaram de 4,5 para 3,7 na primeira semana, ficando nesse valor até o 35° dia, e a acidez variou de 59°D para 81°D na primeira, e de 81°D para 92°D na segunda semana, chegando a 94°D no 35° dia de estocagem; os valores de nitrogênio total não apresentaram alterações significativas nos 35 dias, e as frações de nitrogênio não caseico e não protéico tiveram um aumento de 42 e 39%, respectivamente, em relação ao início da estocagem, indicando que quando o produto foi estocado em temperaturas elevadas ocorreu uma quebra das proteínas em peptídios menores e aminoácidos (Apêndice B).



Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas da bebida láctea durante o período de estocagem. (Bloco 1).

Análises	Dia					
	1	7	14	21	28	35
7°C						
Temperatura (°C)	12,9 ± 0,1 ^a	8,3 ± 0,2 ^b	6,4 ± 0,1 ^d	7,1 ± 0,0 ^c	7,2 ± 0,0 ^c	7,1 ± 0,0 ^c
pH	4,5 ± 0,0 ^a	4,2 ± 0,0 ^b	4,1 ± 0,0 ^c	4,1 ± 0,0 ^c	4,1 ± 0,0 ^c	4,1 ± 0,0 ^c
Acidez (°D)	59,0 ± 2,3 ^a	63,5 ± 1,2 ^b	63,0 ± 0,5 ^b	63,0 ± 0,2 ^b	63,0 ± 0,1 ^b	63,5 ± 0,0 ^b
Gordura (%)	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a
Cinzas (%)	0,52 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,03 ^a	0,50 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,03 ^a
Sólidos totais (%)	18,36 ± 0,09 ^a	18,59 ± 0,02 ^a	18,34 ± 0,02 ^a	17,42 ± 0,02 ^a	18,76 ± 0,02 ^a	18,45 ± 0,03 ^a
Proteína total (%)	1,71 ± 0,02 ^a	1,58 ± 0,06 ^a	1,86 ± 0,12 ^a	1,91 ± 0,10 ^a	1,68 ± 0,02 ^a	1,62 ± 0,01 ^a
N sol em pH 4,6	0,08 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,00 ^b
N sol TCA 12%	0,03 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,01 ^c	0,04 ± 0,00 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a
37°C						
Temperatura (°C)	12,9 ± 0,1 ^a	34,0 ± 0,0 ^b	35,5 ± 0,1 ^b	37,5 ± 0,1 ^b	38,0 ± 0,0 ^b	37,0 ± 0,0 ^b
pH	4,5 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,0 ^b	3,7 ± 0,0 ^b	3,7 ± 0,0 ^b	3,7 ± 0,0 ^b	3,7 ± 0,0 ^b
Acidez (°D)	59,0 ± 2,3 ^d	81,0 ± 1,6 ^c	92,0 ± 0,6 ^b	92,0 ± 0,3 ^b	94,0 ± 0,2 ^a	94,0 ± 0,1 ^a
Gordura (%)	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,0 ^a
Cinzas (%)	0,52 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,05 ^a	0,47 ± 0,02 ^a	0,51 ± 0,03 ^a	0,52 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,10 ^a
Sólidos totais (%)	18,36 ± 0,09 ^a	19,78 ± 0,12 ^a	18,87 ± 0,06 ^a	17,96 ± 0,09 ^a	18,11 ± 0,12 ^a	18,26 ± 0,06 ^a
Proteína total (%)	1,71 ± 0,02 ^a	1,78 ± 0,02 ^a	1,66 ± 0,06 ^a	1,62 ± 0,03 ^a	1,72 ± 0,02 ^a	1,70 ± 0,05 ^a
N sol em pH 4,6	0,08 ± 0,00 ^c	0,08 ± 0,01 ^c	0,11 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,00 ^d	0,12 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,01 ^a
N sol TCA 12%	0,03 ± 0,00 ^d	0,04 ± 0,00 ^c	0,05 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^a

^{a,b,c,d,e} Médias em uma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0,05$).

N sol pH 4,6: Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (não caseico).

N sol TCA: Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% (não protéico).



Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco 2).

Análises	Dia					
	1	7	14	21	28	35
7°C						
Temperatura (°C)	12,0 ± 0,0 ^a	9,2 ± 0,2 ^b	7,2 ± 0,1 ^c	7,1 ± 0,0 ^c	7,1 ± 0,0 ^c	7,1 ± 0,0 ^c
pH	4,5 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,0 ^b	4,2 ± 0,0 ^b	4,1 ± 0,0 ^c	4,1 ± 0,0 ^c	4,1 ± 0,0 ^c
Acidez (°D)	59,0 ± 0,0 ^a	63,0 ± 0,2 ^b	62,5 ± 0,8 ^b	63,0 ± 0,3 ^b	63,0 ± 0,2 ^b	63,5 ± 0,0 ^b
Gordura (%)	1,6 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a
Cinzas (%)	0,51 ± 0,03 ^c	0,49 ± 0,02 ^c	0,47 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,03 ^{b,c}	0,51 ± 0,01 ^c	0,54 ± 0,03 ^d
Sólidos totais (%)	18,41 ± 0,12 ^a	17,77 ± 0,02 ^a	17,59 ± 0,02 ^a	18,22 ± 0,02 ^a	17,46 ± 0,02 ^a	18,37 ± 0,03 ^a
Proteína total (%)	1,92 ± 0,08 ^a	1,88 ± 0,06 ^a	1,82 ± 0,26 ^a	1,91 ± 0,18 ^a	1,76 ± 0,04 ^a	1,62 ± 0,01 ^a
N sol em pH 4,6	0,08 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,01 ^c	0,10 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,01 ^{a,b}	0,10 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,00 ^b
N sol TCA 12%	0,03 ± 0,00 ^c	0,03 ± 0,01 ^c	0,04 ± 0,00 ^{a,b}	0,04 ± 0,01 ^{a,b}	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a
25°C						
Temperatura (°C)	12,0 ± 0,0 ^a	23,2 ± 0,3 ^b	25,3 ± 0,1 ^b	25,2 ± 0,0 ^b	25,2 ± 0,0 ^b	25,3 ± 0,0 ^b
pH	4,5 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,0 ^b	4,0 ± 0,0 ^b	4,0 ± 0,0 ^b	3,9 ± 0,0 ^b	3,9 ± 0,0 ^b
Acidez (°D)	59,0 ± 0,0 ^a	70,0 ± 0,1 ^d	70,0 ± 0,1 ^b	70,0 ± 0,0 ^b	90,0 ± 0,1 ^a	90,0 ± 0,1 ^a
Gordura (%)	1,6 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a
Cinzas (%)	0,51 ± 0,03 ^a	0,49 ± 0,02 ^a	0,45 ± 0,02 ^a	0,47 ± 0,06 ^a	0,49 ± 0,05 ^a	0,53 ± 0,02 ^a
Sólidos totais (%)	18,41 ± 0,12 ^a	18,68 ± 0,12 ^a	18,25 ± 0,04 ^{a,b}	18,45 ± 0,09 ^b	18,55 ± 0,12 ^b	18,32 ± 0,06 ^{a,b}
Proteína total (%)	1,92 ± 0,08 ^a	1,81 ± 0,02 ^a	1,56 ± 0,06 ^a	1,72 ± 0,03 ^a	1,77 ± 0,02 ^a	1,58 ± 0,05 ^a
N sol em pH 4,6	0,08 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,02 ^c	0,10 ± 0,02 ^d	0,11 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,02 ^a
N sol TCA 12%	0,03 ± 0,00 ^c	0,04 ± 0,01 ^c	0,05 ± 0,02 ^b	0,05 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^a

^{a,b,c,d,e} Médias em uma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0,05$).

N sol pH 4,6: Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (não caseico).

N sol TCA: Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% (não protéico).



No Apêndice A os Gráficos (a) e (b) mostram, respectivamente, o efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre os valores de pH e de acidez titulável da bebida láctea. A diminuição mais acentuada do pH, na estocagem da bebida a 25°C e 37°C, ocorreu devido a maior atividade metabólica das bactérias lácticas nessas temperaturas, que transformaram lactose em ácido lático, contribuindo para a queda do pH. Os valores de acidez titulável do produto sofreram um acréscimo a partir da primeira semana de estocagem (Figura 7), sendo que a 7°C o aumento foi mais lento. O aumento da acidez titulável de uma bebida láctea ocorre em maior ou menor grau em função da temperatura que esta foi armazenada e do tempo de estocagem da mesma, pela mesma razão da produção de ácido lático, acima citado (PEREIRA, 2002).

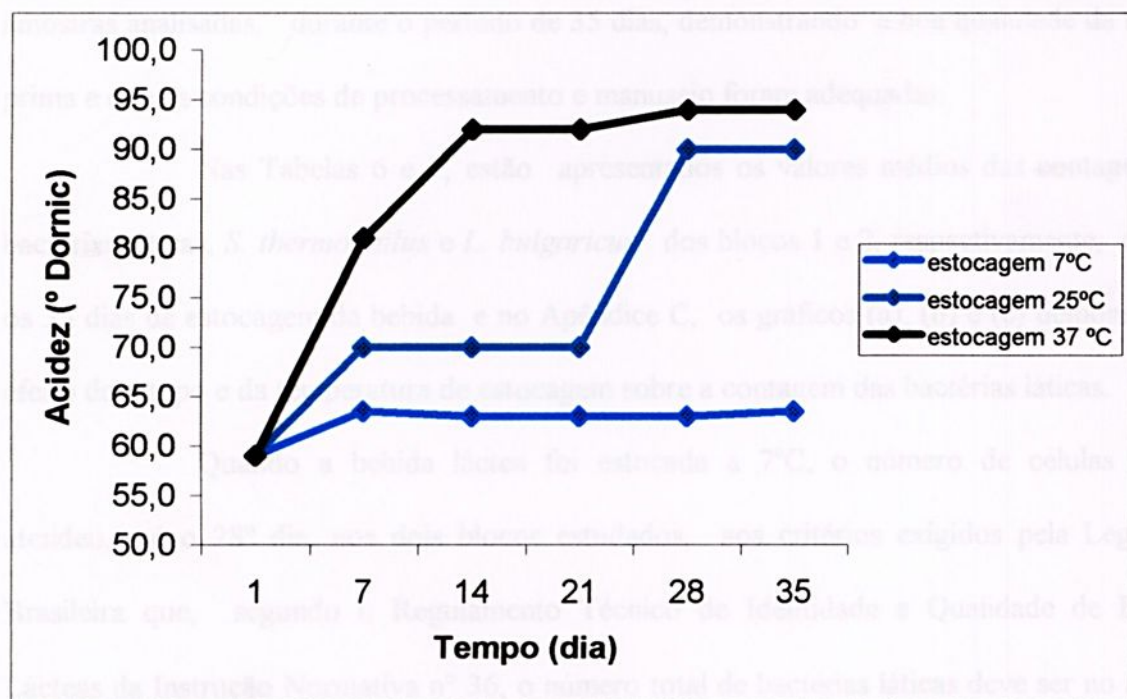


Figura 7 – Valores médios da acidez titulável da bebida láctea durante a estocagem.

L. bulgaricus. Por não haver degradação da gordura, como o esperado, não houve variação no teor de gordura da bebida durante o período de estocagem. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados do Ministério da Agricultura e Abastecimento Brasil (2000), estabelece para as bebidas lácteas semi-desnatadas, um valor de 0,5 a 2,9% de gordura, estando portanto o produto dentro dos padrões estabelecidos pelo regulamento. O teor de sólidos é importante para evidenciar suas propriedades físicas, como a consistência e a viscosidade, e pelo valor nutritivo do produto e pode variar de 9 a 30% nos leites fermentados (TAMIME; ROBINSON, 1991).

5.3 Caracterização microbiológica da bebida láctea

Não foram detectados coliformes, bolores e leveduras em nenhuma das amostras analisadas, durante o período de 35 dias, demonstrando a boa qualidade da matéria prima e que as condições de processamento e manuseio foram adequadas.

Nas Tabelas 6 e 7, estão apresentados os valores médios das contagens das bactérias lácticas, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, dos blocos 1 e 2, respectivamente, durante os 35 dias de estocagem da bebida e no Apêndice C, os gráficos (a), (b) e (c) demonstram o efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a contagem das bactérias lácticas.

Quando a bebida láctea foi estocada a 7°C, o número de células viáveis atendeu, até o 28º dia, nos dois blocos estudados, aos critérios exigidos pela Legislação Brasileira que, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa nº 36, o número total de bactérias lácticas deve ser no mínimo de 10^6 UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2000).

Os resultados da análise de variância demonstraram que o tempo de estocagem afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* e de



L. bulgaricus, reduzindo 6 e 4 ciclos logarítmicos, respectivamente, o número de células viáveis, devido provavelmente, a baixa tolerância dessas bactérias ao pH ácido da bebida, mesmo quando esta foi estocada na temperatura adequada de 7°C.

Tabela 6 - Média dos resultados obtidos das contagens das bactérias lácticas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco1).

°C	Dia	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. bulgaricus</i> (UFC/mL)	Total (UFC/mL)
7				
	1	6,0 x 10 ⁸ a	7,4 x 10 ⁶ a	6,0 x 10 ⁸ a
	7	4,9 x 10 ⁸ a	3,3 x 10 ⁶ a	4,9 x 10 ⁸ a
	14	3,8 x 10 ⁷ b	4,2 x 10 ⁴ b	3,8 x 10 ⁷ b
	21	2,6 x 10 ⁶ b	2,3 x 10 ⁴ b	2,6 x 10 ⁶ b
	28	2,2 x 10 ⁶ b	9,0 x 10 ² c	2,2 x 10 ⁶ c
	35	3,5 x 10 ⁴ c	2,7 x 10 ² c	3,5 x 10 ⁴ c
37				
	1	6,0 x 10 ⁸ a	7,4 x 10 ⁶ a	6,0 x 10 ⁸ a
	7	2,9 x 10 ⁶ b	3,3 x 10 ⁶ b	3,2 x 10 ⁶ b
	14	4,6 x 10 ⁵ b	1,4 x 10 ³ c	4,6 x 10 ⁵ c
	21	-	3,2 x 10 ⁴ c	3,2 x 10 ⁴ c
	28	-	4,1 x 10 ² c	4,1 x 10 ² c
	35	-	-	-

^{a,b,c} Médias em uma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente (p<0,05)

A análise de variância mostrou que as diferenças encontradas nas contagens das bactérias lácticas, durante o período de estocagem, nas temperaturas de 7°C, 23°C e 37 °C, foram significativas estatisticamente, como demonstrado nas Tabelas 6 e 7, através do Teste de Tukey.

O número de células viáveis do *S. thermophilus* foi maior que a do *L. bulgaricus*, em todas as temperaturas de estocagem. Segundo Pereira (2002), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrollado de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e a baixos valores de pH. Para evitar este problema, as

Tabela 7 - Média dos resultados obtidos das contagens das bactérias lácticas da bebida láctea durante o período de estocagem (Bloco2).

°C	Dia	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. bulgaricus</i> (UFC/mL)	Total (UFC/mL)
7				
	1	2,7 x 10 ¹⁰ a	5,4 x 10 ⁶ a	2,7 x 10 ¹⁰ a
	7	7,3 x 10 ⁸ b	2,9 x 10 ⁶ a	7,3x 10 ⁸ a
	14	8,8 x 10 ⁶ c	7,5 x 10 ⁴ b	8,8 x 10 ⁶ b
	21	4,7 x 10 ⁶ c	3,6 x 10 ² c	4,7 x 10 ⁶ b
	28	5,3 x 10 ⁶ c	3,8x 10 ² c	5,3 x 10 ⁶ b
	35	4,9 x 10 ⁴ c	2,7 x 10 ² c	4,9 x 10 ⁴ c
25				
	1	2,7 x 10 ¹⁰ a	5,4 x 10 ⁶ a	2,7 x 10 ¹⁰ a
	7	5,1 x 10 ⁸ a	6,2 x 10 ⁴ b	5,1 x 10 ⁸ a
	14	7,0 x 10 ⁴ b	1,4 x 10 ⁴ b	8,4 x 10 ⁴ b
	21	2,8 x 10 ³ b	2,9 x 10 ³ c	5,7 x 10 ³ c
	28	-	2,2 x 10 ² c	2,2 x 10 ² c
	35	-	2,4 x 10 ² c	2,4 x 10 ² c

^{a,b,c} Médias em uma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente (p<0,05)

Como demonstrado na Tabela 7, a 25°C, a partir do 28º dia de estocagem, não foram encontradas células viáveis de *S. thermophilus* e a contagem total de células viáveis foi inferior ao mínimo exigido pela legislação, após primeira semana de estocagem. A partir do 7º dia, na bebida láctea estocada a 37°C, a contagem de células viáveis das bactérias lácticas também não mais atendeu aos padrões mínimos exigidos.

A análise de variância mostrou que as diferenças encontradas na contagem das bactérias lácticas, durante o período de estocagem, nas temperaturas de 7°C, 25°C e 37 °C, foram significativas estatisticamente, como demonstrado nas Tabelas 6 e 7, através do Teste de Tukey.

O número de células viáveis do *S. thermophilus* foi maior que a do *L. bulgaricus*, em todas as temperaturas de estocagem. Segundo Pereira (2002), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e a baixos valores de pH. Para evitar esse problema, as

indústrias fabricantes de culturas lácticas fornecem culturas tradicionais com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*. Atualmente, a relação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em leites fermentados pode variar de 7:1 a 10:1.

5.4 – Caracterização sensorial da bebida láctea

Os resultados da avaliação dos atributos sensoriais “consistência”, “sabor e aroma” e “aceitabilidade geral” obtidos durante os 35 dias de estocagem, nos blocos 1 e 2, estão apresentados nas Tabelas 8 e 9 e no Apêndice D.

De uma maneira geral, para as amostras mantidas a 7°C, o tempo de estocagem não influenciou significativamente na aceitação do produto nos três atributos avaliados. Os provadores gostaram da bebida, cuja nota dada por eles, no atributo “aceitabilidade geral”, no final do período, foi de 7,84 (bloco 1), e de 7,62 (bloco 2), que corresponde a 87% e 85%, respectivamente, do valor máximo da escala de 9 pontos, representada pela categoria “gostei extremamente”.

Tabela 8 – Média dos resultados obtidos na avaliação sensorial da bebida láctea (bloco1).

°C	Análises	Dia					
		1	7	14	21	28	35
7	Consistência	3,96 ^a	3,80 ^a	3,96 ^a	3,88 ^a	3,92 ^a	3,84 ^a
	Sabor e aroma	4,00 ^a	4,04 ^a	4,20 ^a	4,12 ^a	4,24 ^a	4,20 ^a
	Aceitabilidade geral	7,88 ^a	7,52 ^a	7,64 ^a	7,48 ^a	7,56 ^a	7,84 ^a
37	Consistência	3,96 ^a	3,40 ^a	3,44 ^a	-	-	-
	Sabor e aroma	4,00 ^a	3,76 ^a	6,60 ^b	-	-	-
	Aceitabilidade geral	7,88 ^a	6,76 ^a	2,19 ^b	-	-	-

^{a,b} Médias em uma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente (p<0,05)



Tabela 9 – Média dos resultados obtidos na avaliação sensorial da bebida láctea (bloco2).

°C	Análises	Dia					
		1	7	14	21	28	35
7	Consistência	3,52 ^a	3,72 ^a	3,72 ^a	3,76 ^a	3,80 ^a	3,60 ^a
	Sabor e aroma	4,00 ^a	4,28 ^a	3,98 ^a	4,12 ^a	4,48 ^a	4,33 ^a
	Aceitabilidade geral	7,56 ^a	7,60 ^a	7,60 ^a	7,32 ^a	7,04 ^a	7,62 ^a
25	Consistência	3,52 ^a	3,60 ^a	3,52 ^a	2,80 ^b	-	-
	Sabor e aroma	4,00 ^a	4,00 ^a	5,40 ^b	6,44 ^c	-	-
	Aceitabilidade geral	7,56 ^a	7,48 ^a	5,16 ^b	3,96 ^b	-	-

^{a,b,c} Médias em uma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente (p<0,05).

Quando mantida a 25°C, os provadores aceitaram bem a bebida, nos primeiros 7 dias, porém a partir do 14º dia, começaram a observar no atributo “sabor e aroma”, um produto “mais ácido” do que gostariam, e no atributo “consistência”, um produto menos consistente do que gostariam, reduzindo com isso a “aceitabilidade geral”, que no 21º dia de estocagem foi de 3,96, representada pela categoria “desgostei moderadamente”.

A análise de variância dos resultados demonstrou que houve diferença significativa entre as médias, em todos os atributos avaliados, quando a bebida láctea foi estocada a 25 °C, como mostram os resultados do Teste de Tukey (Tabela 8).

A estocagem a 37°C exerceu influência negativa na qualidade do produto, limitando sua aceitação a partir da segunda semana. No atributo “sabor e aroma”, os provadores evidenciaram o caráter ácido e amargo da bebida, devido, respectivamente, à elevada produção de ácido láctico e ao aumento das frações de nitrogênio solúvel, alcançando no atributo “aceitabilidade geral”, média de 2,19 no 14º dia, representada pela categoria “desgostei extremamente”.

A análise de variância dos resultados dos atributos “sabor e aroma” e “aceitabilidade geral”, durante o período de estocagem da bebida láctea mantida a 37°C, demonstraram que houve diferenças significativas entre as médias, conforme mostram os resultados do Teste de Tukey (Tabela 9).

5.5 Estudo de alguns compostos voláteis da bebida láctea

A Figura 8 mostra um cromatograma típico da bebida láctea estudada, evidenciando-se o acetaldeído, pico nº 1, e os componentes químicos I e II do aroma natural de morango, picos nº 2 e 3, além do álcool amílico, padrão interno, pico nº 4. Os picos desses compostos foram identificados isoladamente, através da injeção da substância pura diluída (acetaldeído, aroma natural de morango e álcool amílico), nas mesmas condições estabelecidas para a bebida.

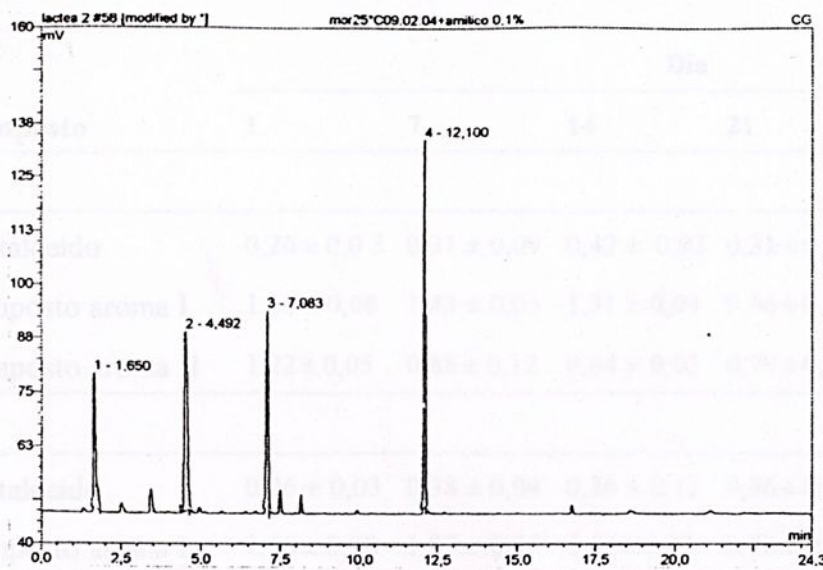


Figura 8 – Cromatograma típico da bebida láctea fermentada.

Tabela 10 – Média dos resultados e desvio padrão da razão de áreas do acetaldeído e dos componentes do aroma de morango, em relação ao padrão interno, presentes na bebida láctea, obtidos por cromatografia gasosa, durante os 35 dias de estocagem (Bloco 1).

°C	Composto	Dia					
		1	7	14	21	28	35
7							
	Acetaldeído	0,32±0,03	0,33 ± 0,08	0,32 ± 0,07	0,55 ± 0,05	0,34± 0,06	0,29± 0,07
	Composto aroma I	1,82 ± 0,13	1,69 ± 0,05	0,66 ± 0,11	1,02±0,07	0,91±0,12	0,85 ± 0,08
	Composto aroma II	1,31±0,07	1,10 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,79±0,06	0,73 ± 0,07	0,44 ± 0,09
37							
	Acetaldeído	0,32± 0,03	0,37 ± 0,09	0,35 ± 0,06	0,35 ± 0,08	0,51 ± 0,04	0,32 ± 0,03
	Composto aroma I	1,82 ± 0,13	1,19 ± 0,05	1,09 ± 0,03	1,01 ± 0,11	0,85 ± 0,09	0,79±0,09
	Composto aroma II	1,31± 0,07	0,97 ± 0,16	0,56±0,02	0,48 ± 0,09	0,44± 0,06	0,47±0,08

Tabela 11 – Média dos resultados e desvio padrão da razão de áreas do acetaldeído e dos componentes do aroma de morango, em relação ao padrão interno, presentes na bebida láctea, obtidos por cromatografia gasosa, durante os 35 dias de estocagem (Bloco 2).

°C	Composto	Dia					
		1	7	14	21	28	35
7							
	Acetaldeído	0,26 ± 0,0 3	0,31 ± 0,09	0,42 ± 0,03	0,31±0,04	0,34 ± 0,05	0,29 ± 0,02
	Composto aroma I	1,66± 0,08	1,43 ± 0,05	1,31 ± 0,04	0,96±0,07	0,77 ± 0,07	0,65 ± 0,06
	Composto aroma II	1,22±0,05	0,88± 0,12	0,64 ± 0,03	0,79±0,11	0,61 ± 0,08	0,54 ± 0,09
25							
	Acetaldeído	0,26 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,36 ± 0,12	0,36±0,05	0,55 ± 0,08	0,30 ± 0,04
	Composto aroma I	1,66± 0,08	1,83 ± 0,15	1,42±0,19	0,78± 0,08	0,87 ±0,06	0,86± 0,09
	Composto aroma II	1,22±0,05	1,01 ± 0,06	0,78±0,09	0,65±0,09	0,57±0,03	0,56± 0,15

LIBRATON, A. B. S. (Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas) Comunicação pessoal, 2004.

* KILBERT, I. (Dona Ediva Industrial, Joropó do Sul) Comunicação pessoal, 2004.



Conforme mostram as Tabelas 10 e 11 e o Apêndice E, os níveis de acetaldeído presentes no produto aumentaram durante a estocagem, devido provavelmente, o metabolismo das bactérias lácticas não cessar completamente durante esse período, mesmo na temperatura adequada de 7°C. Segundo Lerayer (2004)² o acetaldeído produzido pelas bactérias lácticas durante o processo da fermentação é um composto estável nas temperaturas analisadas, mesmo quando submetido a períodos de estocagem prolongados.

Os níveis dos compostos voláteis presentes no aroma natural de morango, adicionado ao produto, nas três temperaturas estudadas, diminuíram progressivamente durante todo o período de estocagem, alcançando, no 35º dia, números inferiores à metade dos encontrados no primeiro dia de fabricação. Segundo Kelbert (2004)³, o aroma natural de morango, adicionado à bebida, é elaborado por uma mistura de compostos voláteis das funções: ésteres, aldeídos, álcoois, lactonas e cetonas, que conferem sabor e aroma ao produto, porém esses compostos vão perdendo sua característica volátil ao interagirem com os componentes da bebida, durante o período de estocagem e ficam retidos no gel da bebida. Esses compostos são termicamente estáveis em temperaturas inferiores a 80°C.

² LERAYER, A.L.S. (Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas) Comunicação pessoal, 2004.

³ KELBERT, I. (Duas Rodas Industrial, Jaraguá do Sul) Comunicação pessoal, 2004.



5.6 Considerações finais

- De modo geral o valor de pH diminuiu e a acidez aumentou durante o período de estocagem da bebida. Entretanto com a elevação da temperatura, observou-se uma maior queda do pH e um maior o aumento da acidez, indicando que uma elevação de temperatura na estocagem oferece a desvantagem de uma maior acidificação do produto.
- As frações de nitrogênio solúvel (não caseico e não protéico) aumentaram com a elevação da temperatura de estocagem, devido, provavelmente a uma maior atividade das bactérias lácticas que promoveram a quebra das proteínas em frações menores (peptídeos e aminoácidos), podendo essas frações terem sido a causa do sabor amargo do produto, detectado pelos provadores.
- Os resultados da análise sensorial consideraram a bebida láctea como boa até uma semana após sua validade (30 dias), quando estocada na temperatura adequada de 7°C, porém quando elevou-se a temperatura de estocagem para 25°C e 37°C houve uma limitação na “aceitação geral” pelos provadores no 21º e 14º dia, respectivamente, que detectaram um “aumento de acidez” e presença de sabor amargo no produto.
- Durante a estocagem, os números de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* diminuíram significativamente, nas três temperaturas estudadas. No entanto, na temperatura de conservação adequada, 7°C, esses números mantiveram-se dentro dos padrões exigidos pela legislação, até o 28º dia de estocagem, porém ao aumentar-se a



temperatura de estocagem, tais números diminuíram para valores abaixo desses padrões.

- A produção do acetaldeído ocorre durante o processo fermentativo de obtenção da bebida láctea, por este motivo foram detectadas quantidades semelhantes nas bebidas preparadas nos blocos 1 e 2. O acetaldeído revelou ser um composto estável termicamente e não apresentou sinais de degradação, nas diferentes temperaturas estudadas, indicando que as alterações que ocorreram com o produto, em virtude do tempo e da temperatura de estocagem, não afetaram a quantidade de acetaldeído presente na bebida.
- Os compostos voláteis presentes no aroma natural de morango, adicionado à bebida, apresentaram queda progressiva, durante os 35 dias, independente da temperatura de estocagem, porém essa queda está relacionada com a retenção desses compostos que interagem com os componentes presentes na bebida, ficando retidos no gel da bebida, não interferindo no sabor e na aceitação do produto pelos provadores.

CONCLUSÃO

A bebida láctea fermentada, avaliada neste trabalho, não apresentou alterações durante sua vida de prateleira, que pudessem comprometer a sua qualidade e aceitação quando estocada em temperatura adequada de 7°C.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. *Microbiology of the Dairy Industry*. London, 1997.
- ALMEIDA, T. C. A.; FARIA, J. A. P. *Estudo de estabilidade de vida de Própolis*. Revista Engenharia de Alimentos, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-10, 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*. 16 ed. Washington, 1995. 2v.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. O. *Experimentação Agrícola*. Piracicaba: UNESP, 1995. 103p.
- BERMER, M. L. A. *Tecnologia do Leite*. São Paulo, 1987. p. 19-23.
- BOTTAZZI, V.; VESCOVO, M. *Cheese composition produced by yogurt bacteria*. Netherlands Milk Dairy Journal, v. 23, n. 71-78, 1969. Apud CHAVES, A. C. S. O. Engenharia analítica de *Streptococcus thermophilus* para produção de probióticos e sua presença alérgica em leites fermentados. 2002. 123 f. Tese (Dissertação em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2002.
- BRANDÃO, S. C. C. *Tecnologia da Produção Industrial de Iogurte*. São de Fora: ILCI, 1997. Apostila.
- BRANDÃO, S. C. C. *Tecnologia da produção industrial de Iogurte*. Revista Leite e Derivados, São Paulo, n. 23, p. 24-38, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. *Padrões de Identidade e Qualidade de leites fermentados*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 Jan. 2001. Seção 1, p. 19-22.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. *Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite pasteurizado*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 set. 2002. Seção 1, p. 12-22.



REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R., MOSS, M. O. **Microbiologia de Los Alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 1997. p. 330-334.
- ALMEIDA, T. C. A.; FARIA, J. A. F. Análise sensorial e estudos de vida de Prateleira. **Revista Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n. 15, p. 30-32, 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16.ed. Washington, 1995. 2 v.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. D. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal: FUNESP, 1995. 109 p.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. São Paulo, 1987. p. 19-22.
- BOTTAZZI, V.; VESCOVO, M. Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 23, n. 71-78, 1969. Apud CHAVES, A. C. S. D. Engenharia metabólica de *Streptococcus thermophilus* para produção de acetaldeído (via treonina aldolase) em leites fermentados, 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2002.
- BRANDÃO, S. C. C. **Tecnologia da Produção Industrial de Iogurte**. Juiz de Fora: ILCT, 1997. Apostila.
- BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, n. 25, p. 24-38, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Seção 1, p. 19-22.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 set. 2002. Seção 1, p. 12-22.



BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas: instrução normativa n. 36. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 out. 2000.

CABRAL, A. C. D.; FERNANDES, M. H. C. Aspectos gerais sobre a vida de prateleira de produtos alimentícios. **Boletim do ITAL**, Campinas, v. 17, p. 371-440, 1980.

CASE, R. A.; BRADLEY, Jr.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In:— AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 1985.

CHAVES, A. C. S. D. Engenharia Metabólica de *Streptococcus thermophilus* para produção de acetaldeído (via treonina aldolase) em leites fermentados, 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução à Cromatografia em Fase Gasosa**. 4. ed. Campinas: UNICAMP, 1990. p. 141-174.

DAVIES, F. L.; SHANKAR, P. A.; BROOKER, B. E.; HOBBS, D. G. A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effects on gel formation in yoghurt. **Journal of Dairy Research**, v.45, n.1, p. 53-58, 1978.

DUAME, H. E. Making marketable yogurts. **Dairy Fields**, v. 162, n. 12, p. 53-58, 1979.

DUMONT, J. P.; ADDA, J. Méthode rapide {détude} des composés très volatils de l'arôme des produits laitiers. Application au yoghourt. **Lait**, v. 53, p. 12-22, 1973.

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

FURTADO, S. M. P. Estabilizantes empregados em leites fermentados e bebidas lácticas. In: — **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, 1997. Apostila.

GANDHI, D. N.; PATEL, R. S. Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 29, n. 1, p. 25-29, 1994.



GONZALEZ, S.; AMBROSINI, V. M.; NADRA, M. M.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVIER, O. Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 436-440, 1994.

IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **IDF standard 117B**: enumeration of characteristic microorganisms. Brussels, 1997. 5 p.

KNEIFEL, W.; JAROS, D.; ERHARD, F. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 179-189, 1993.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**. 2nd, ed. New York: [s.n.], 1978. 711 p.

KURMANN, J. A. Os fatores biológicos e técnicos da fabricação do iogurte. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. In: – **Anais da XV Semana do Laticinista**. Juiz de Fora: EPAMIG/CT/ILCT, 1977. p. 74-84.

LABUZA, T. P. An integrated approach to food chemistry: Illustrative cases. In: Fenema, O. (Ed.). **Principles of Food Science**. New York: Marcel Dekker, 1975. chap. 16.

LABUZA, T. P. **Shelf-life Dating of Foods**. Westport: Food and Nutrition Press, 1982. 500 p.

LAGRANGE, W. S.; HAMMOND, E. G. The shelf-life of dairy products. In: – CHARALAMBOURS, G. (Ed.). **Shelf-life Studies of Foods Beverages**: chemical, biological, physical and nutritional aspects. Elsevier, 1993. 1024 p.

LEES, G. J.; JAGO, G. R. The role of acetaldehyde in metabolism: a review 2. The metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1216-1224, 1978.

LUCEY, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 281-294, 2002.

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

MAN, C. M. D., JONES, A. A. **Shelf-life Evaluation of Foods**. Savoy, 1996. 321 p.



OLIVEIRA, L. L.; BRANDÃO, S. C. C. B. Aspectos importantes para o controle do rendimento na fabricação de queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 27-39, 2002.

PENNA, A. L. B. **Parâmetros Reológicos de Gomas para a Fabricação de Bebidas Lácteas à Base de Soro**. São Paulo: USP, FCF, 1997. 128 p. Monografia.

PEREIRA, M. A. G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no processo de acidificação e pós-acidificação de iogurte**, 2002, 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. **Yogurt: scientific grounds technology, manufacture and preparation**. Technical Dairy Publishing House, 1978. 427 p.

ROHM, H.; KOVAC, A.; KNEIFEL, W. Effects of starter cultures on sensory properties of set-style yoghurt determined by quantitative descriptive analysis. **Journal Sensory Studies**, v. 9, p. 171-186, 1994.

SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo, v. 2, n. 31, p. 176-185, 1997.

SANTOS, J. A. Tendências para iogurtes: ingredientes que dão um diferencial ao produto. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, n. 63, p. 48-53, 2002.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijos nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. ILTC, Juiz de Fora, v. 3, p. 45-50, 2001.

SCHIMIDT, R. H.; DAVIDSON, S. M.; BATES, R. P. Acetaldehyde determination in fermented food-products by direct 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization, extraction and high-performance liquid-chromatography. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 5, p. 1556-1557, 1983.

SEIBEL, N. F.; CANSIAN, R.L. Análise de diferentes concentrações de soro na produção de bebida láctea. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, n. 52, p. 44-49, 2000.



SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA, L. C. G. **Físico-Química do Leite e Derivados: métodos analíticos**. Juiz de Fora: Templo Gráfica Ltda, 1997. p. 186-194.

SIVIERI, K. **Caracterização e otimização do uso de miméticos de gordura em bebidas lácteas**. 2002. 142f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers” (Litesse e Dairy-lo). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 24-31, 2002.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. Academic Press, 1985.

TAMIME, A. Y., DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 12, p. 939-971, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciencia y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 9-73.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: science and technology**. 2nd, ed. Oxford: Pergamon Press, 1999.

TEIXEIRA NETO, R. O.; VITALI, A. A.; QUAST, D. G.; MORI, E. E. M. **Reações de Transformação e Vida de Prateleira de Alimentos Processados**. Campinas: ITAL, 1993. (Manual técnico, n. 6).

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

TRAMER, J. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 26, n. 16, 1973. 368 p. Apud: TAMIME, A. Y., ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciência y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 166 p.

ULBERTH, F. Headspace gás chromatographic estimation of some yogurt volatiles. **Journal Association of Official Anal Chemistry**. Vienna, v. 74, n. 4, p. 630-634, 1991.

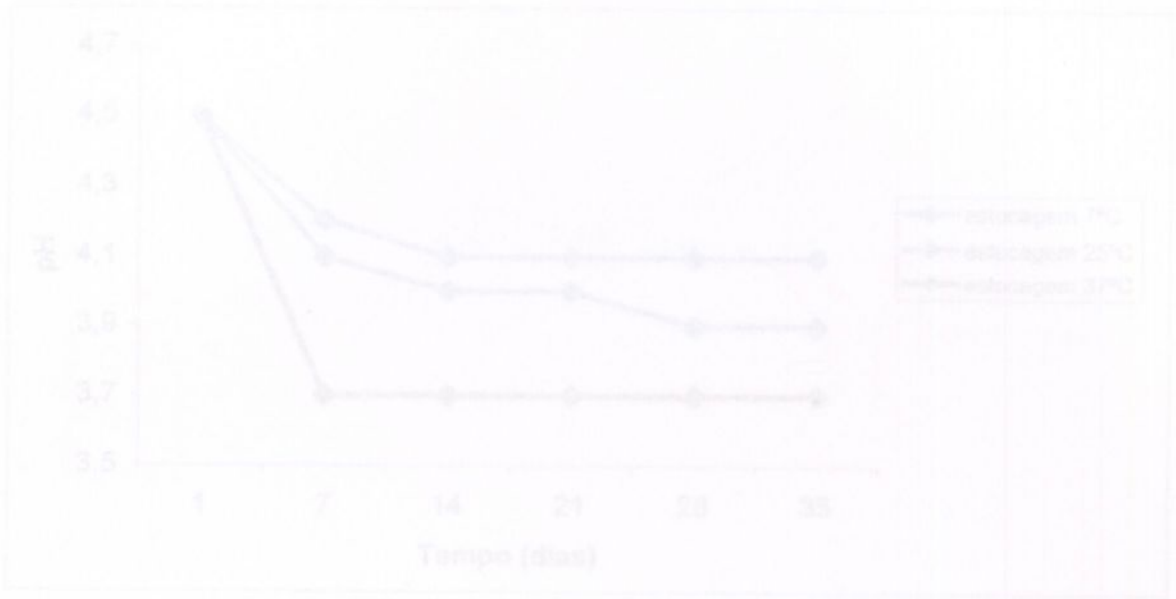


VARNAM, A. H., SUTHERLAND, J. P. **Leche y Productos Lácteos: tecnología, química e microbiología.** Zaragoza: Acribia, 1994. p. 365-380.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy Technology: principles of milk properties and processes.** New York, 1999. 537 p.

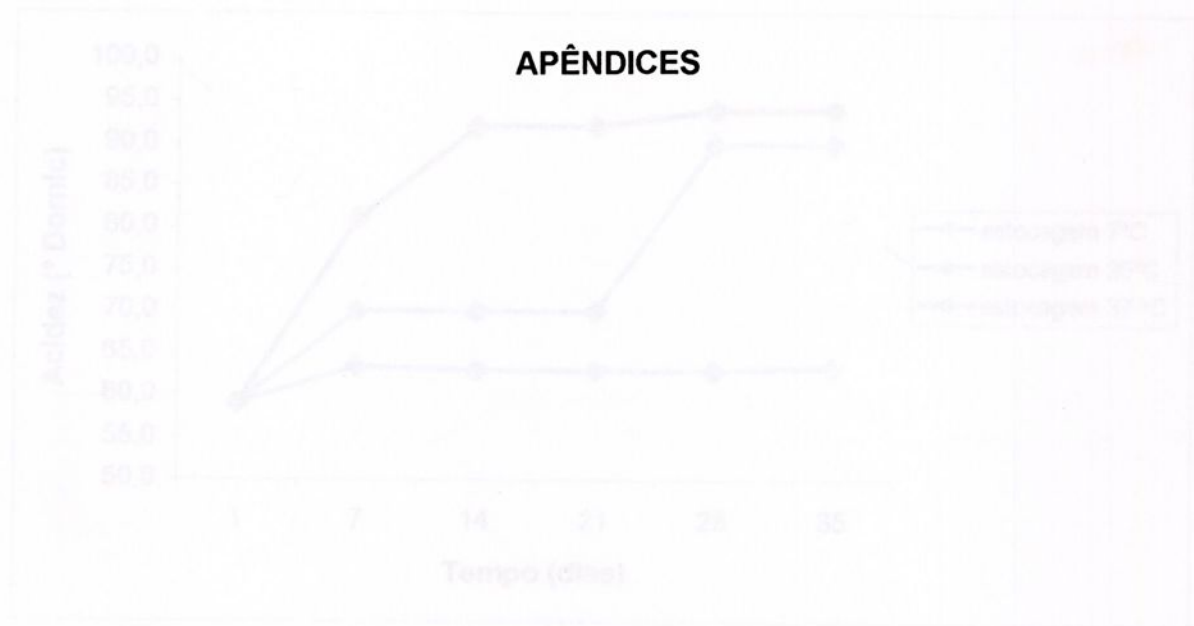
APÊNDICES





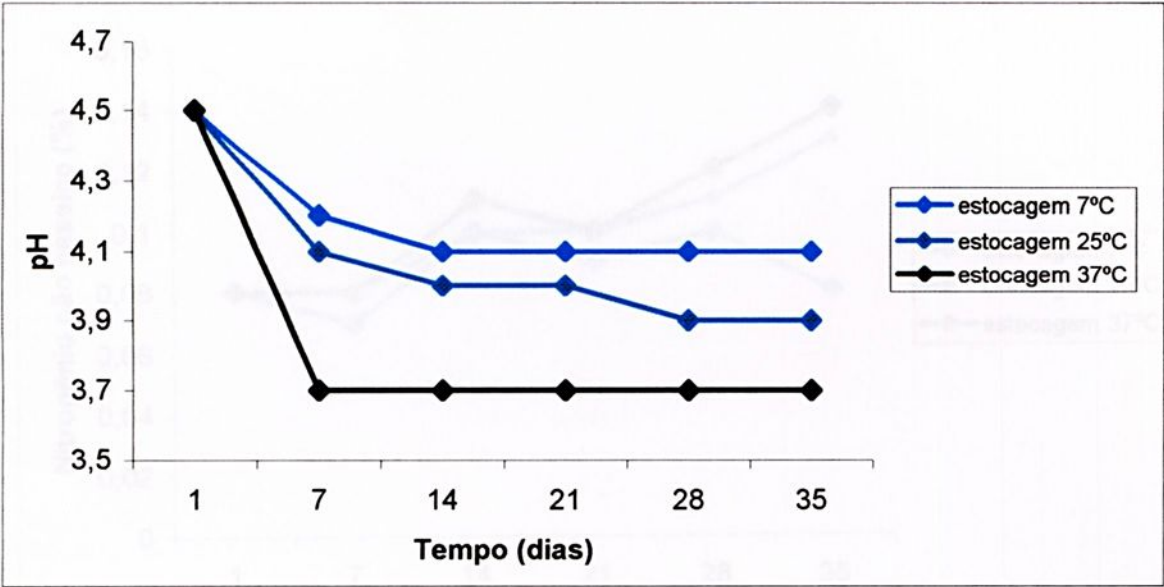
(a)

APÊNDICES

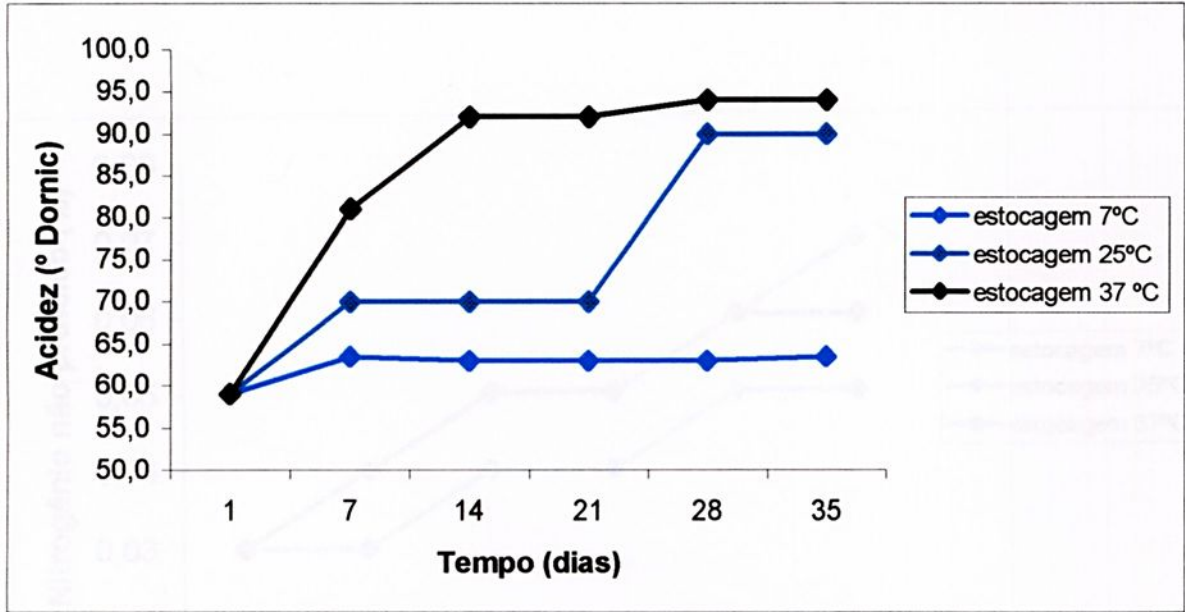


(b)

Apêndice A – Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre o valor de pH (a) e a acidez titulável (b) da bebida láctea.

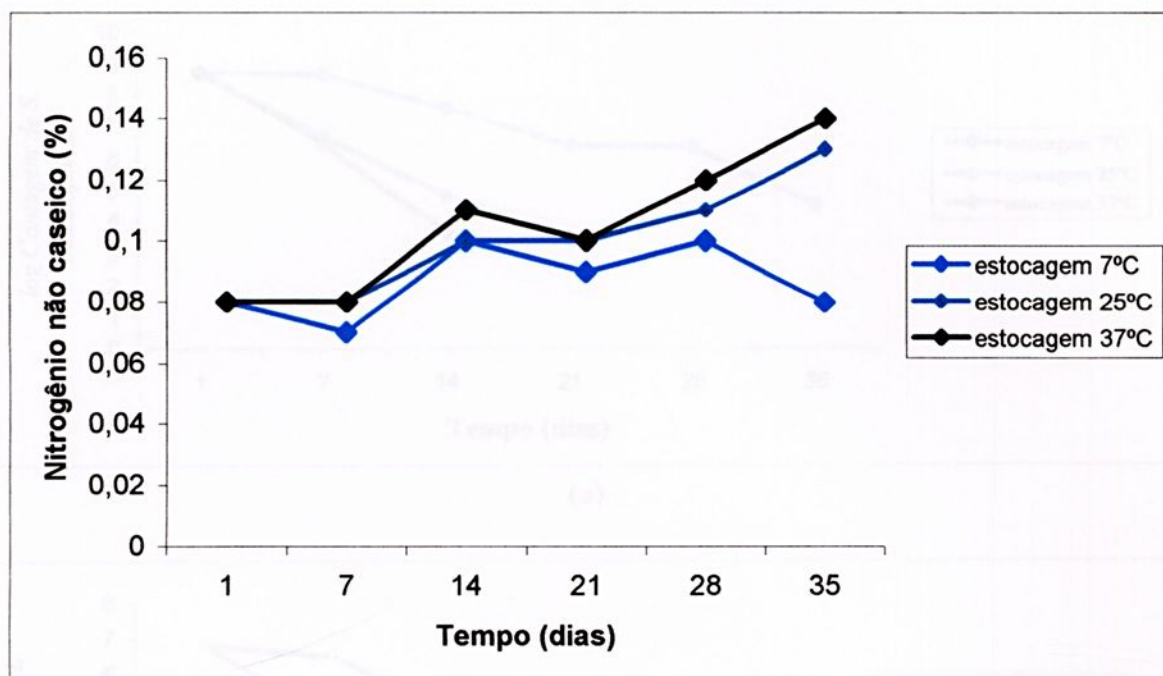


(a)

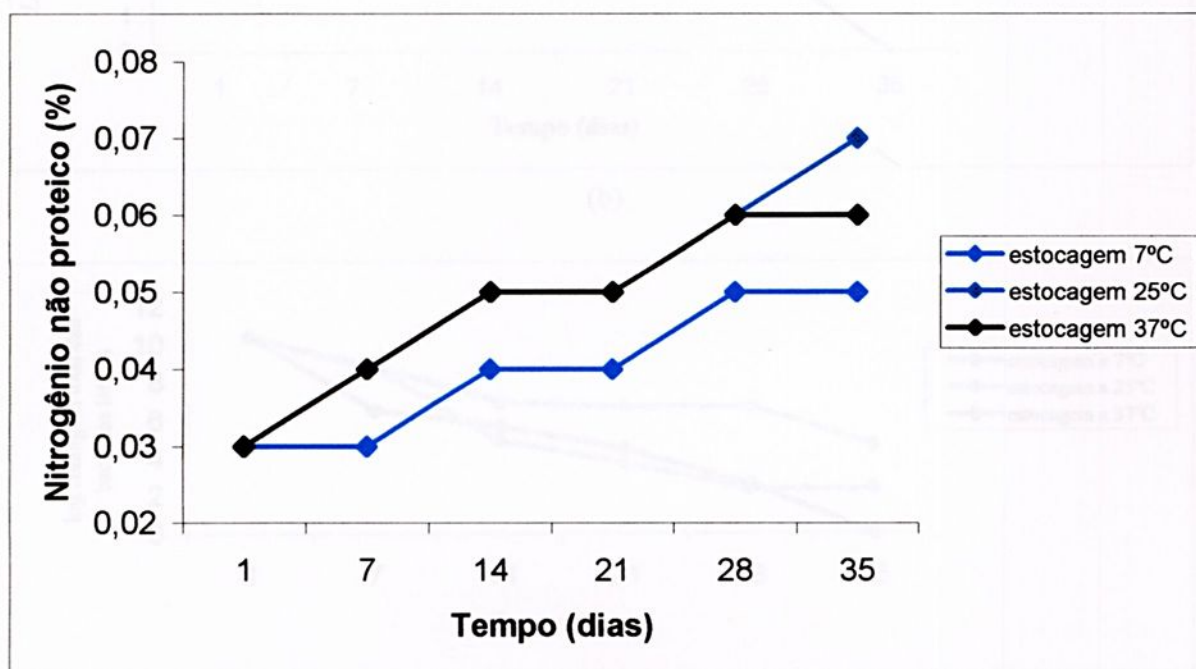


(b)

Apêndice A – Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre o valor de pH (a) e a acidez titulável (b) da bebida láctea.

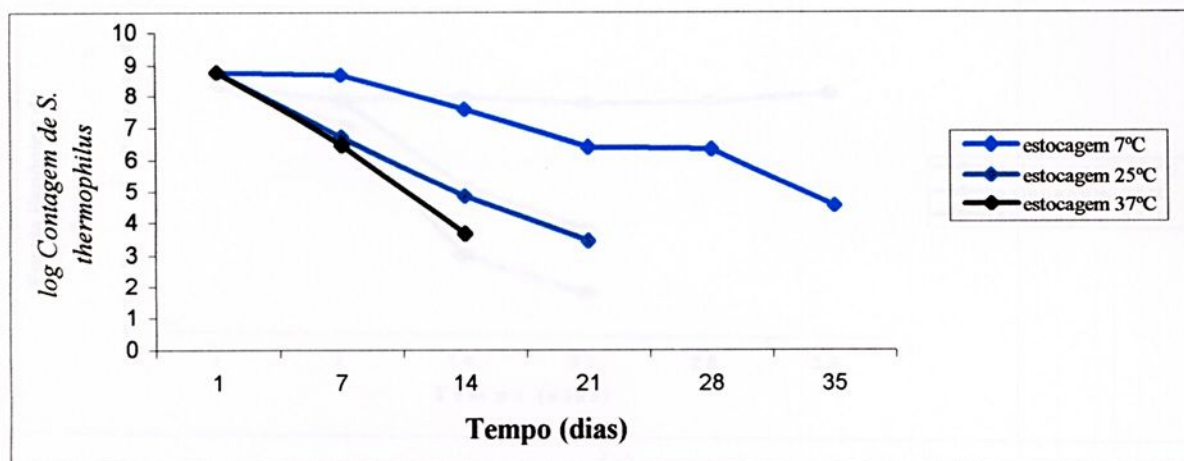


(a)

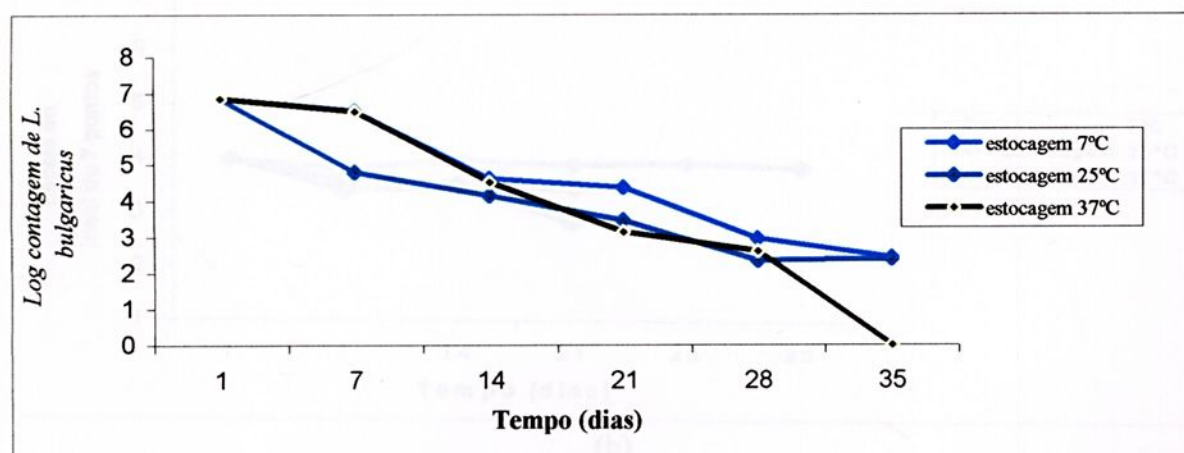


(b)

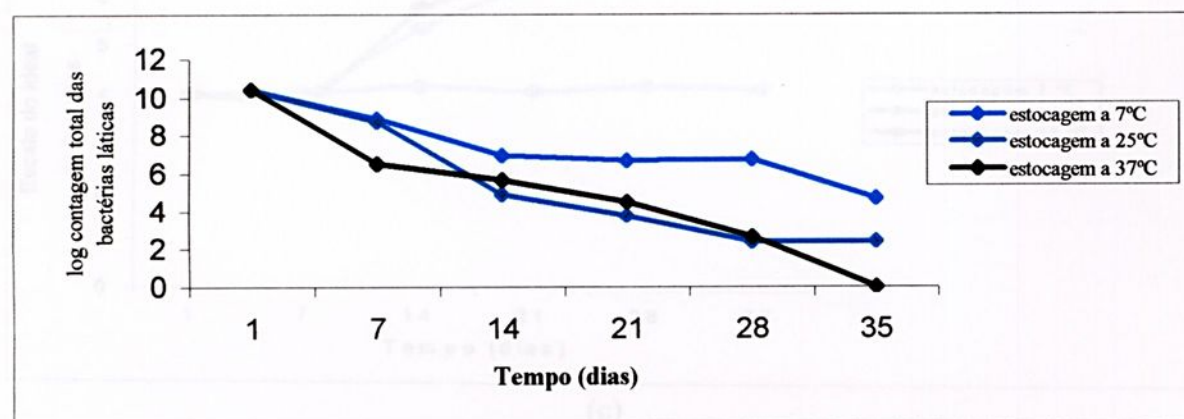
Apêndice B – Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre o nitrogênio não caseico (a) e o nitrogênio não protéico (b) da bebida láctea.



(a)

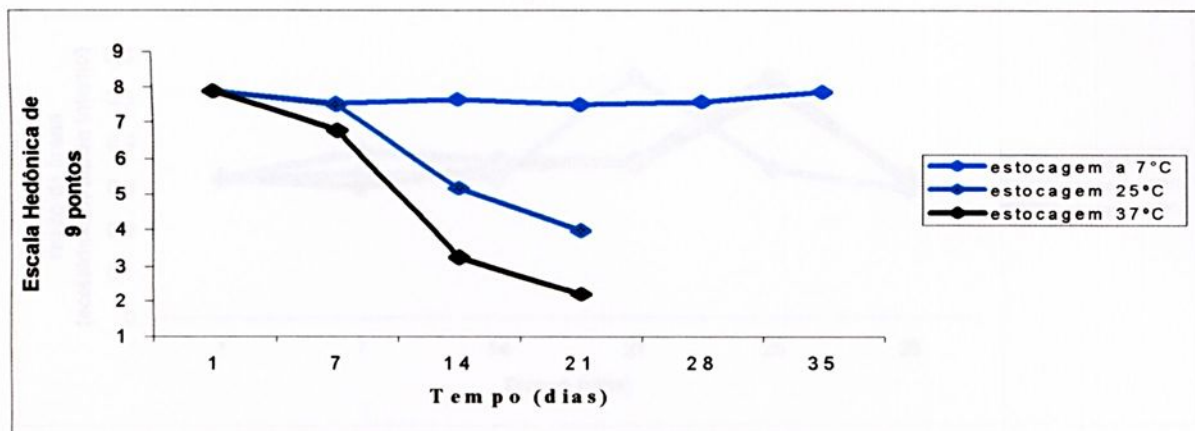


(b)

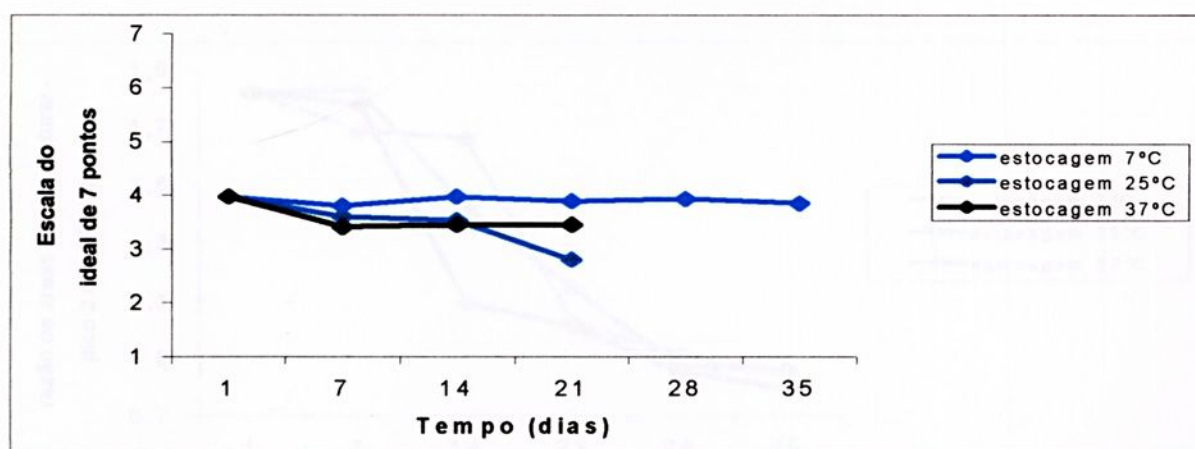


(c)

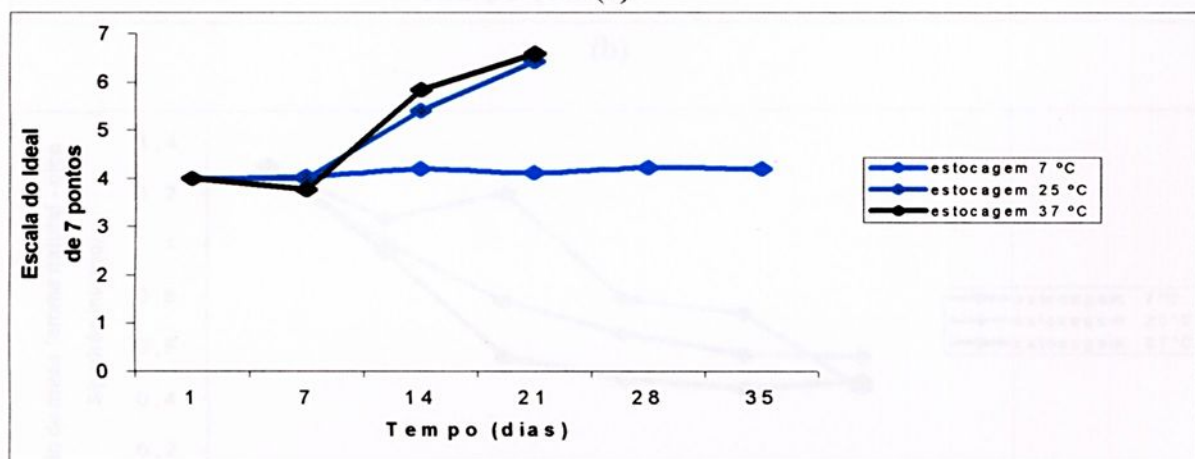
Apêndice C– Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a contagem de *S. thermophilus* (a), *L. bulgaricus* (b) e total das bactérias lácticas (c) da bebida láctea.



(a)

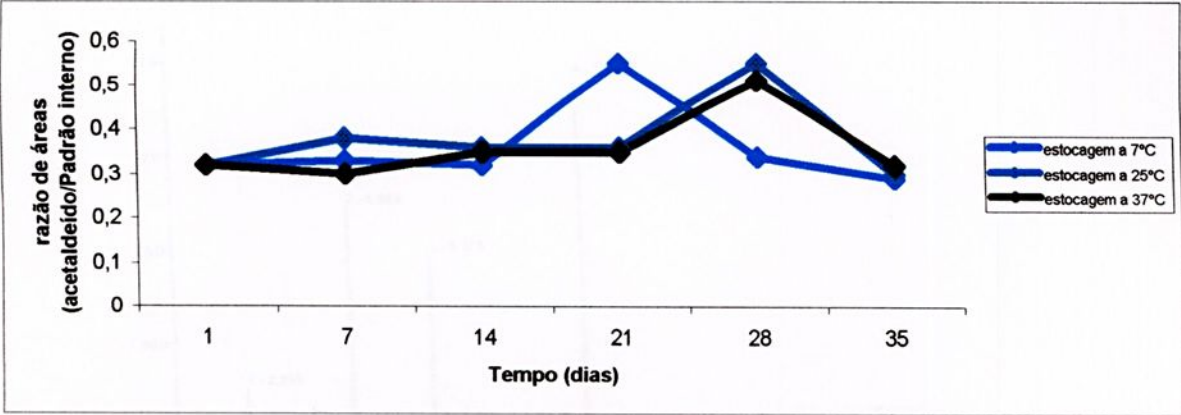


(b)

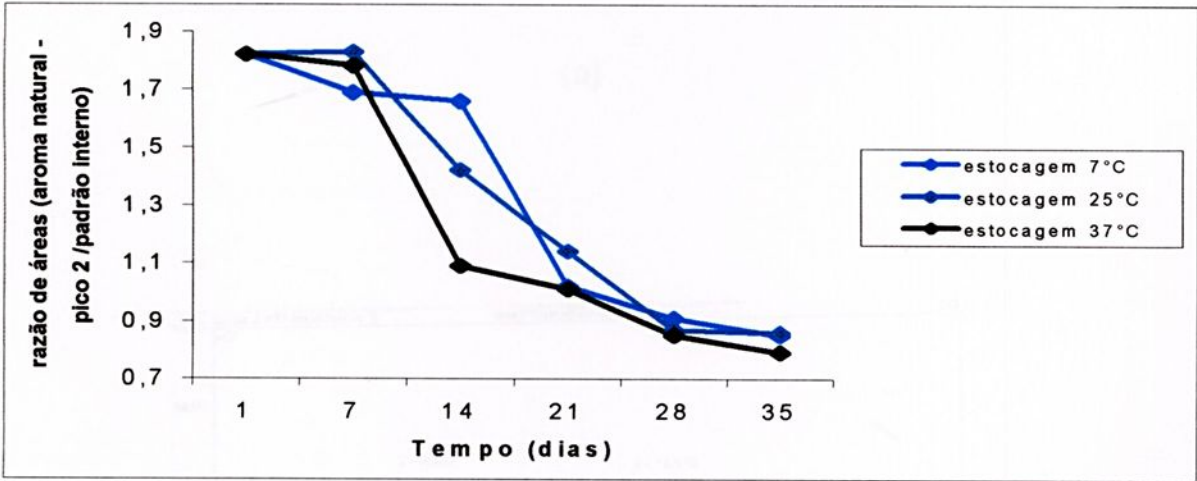


(c)

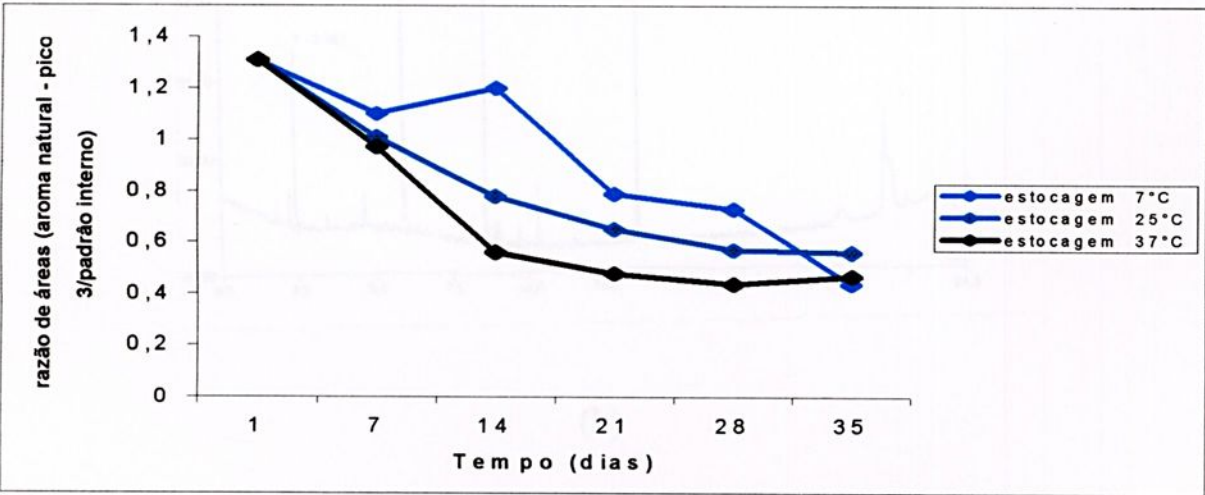
Apêndice D – Efeito do tempo e temperatura de estocagem sobre a “aceitação global” (a), “consistência” (b) e “sabor e aroma” (c) da bebida láctea.



(a)

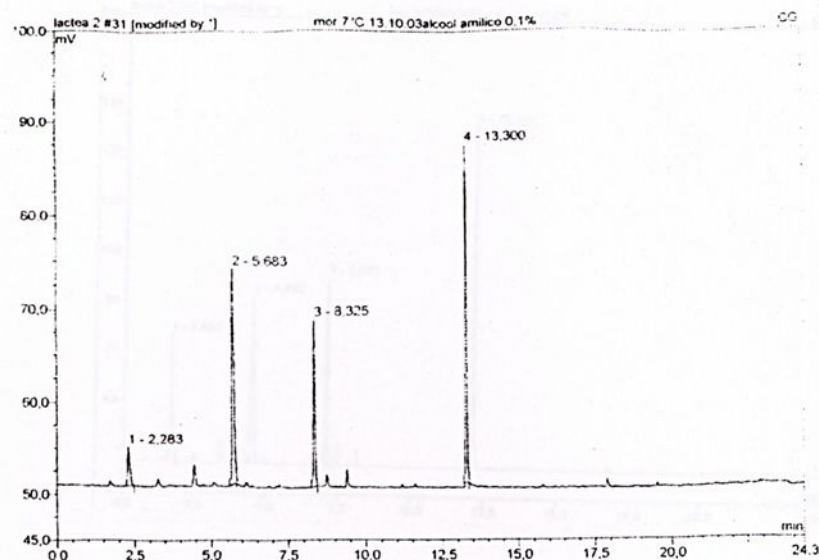


(b)

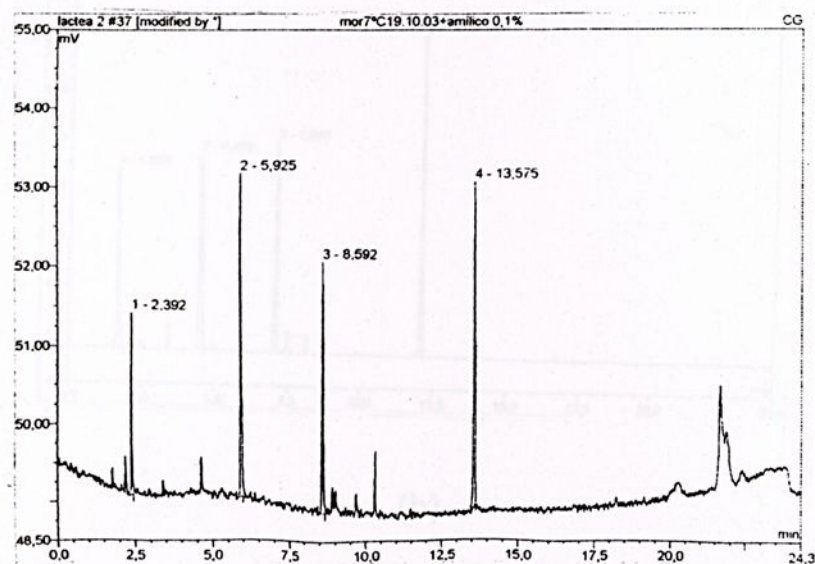


(c)

Apêndice E - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nos níveis do acetaldeído (a), e dos compostos I (b) e II (c), do aroma de morango, adicionado a bebida láctea.

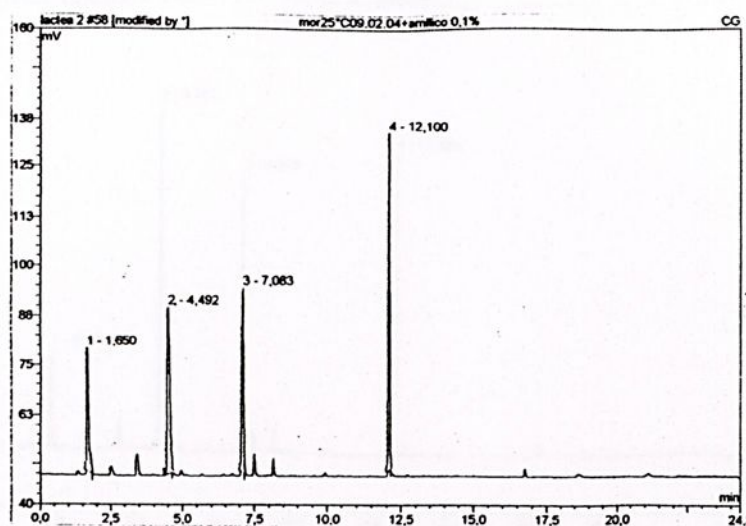


(a)

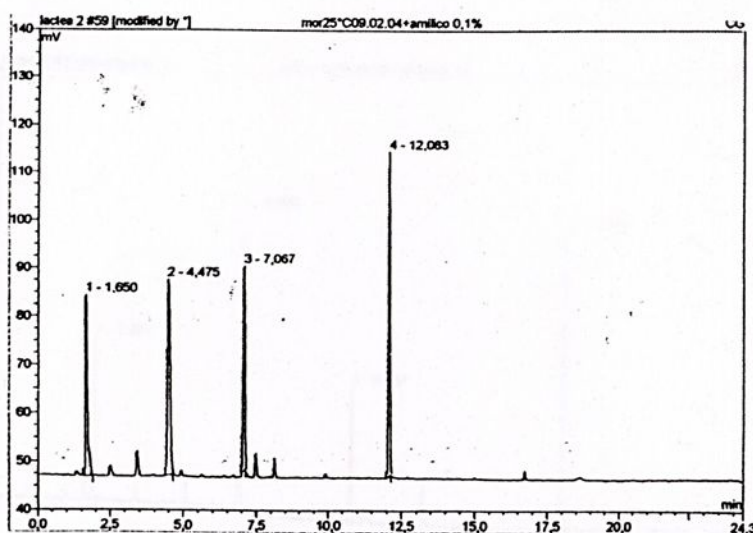


(b)

Apêndice F - Cromatogramas da bebida láctea realizados na segunda (a) e terceira (b) semanas de estocagem a 7°C .



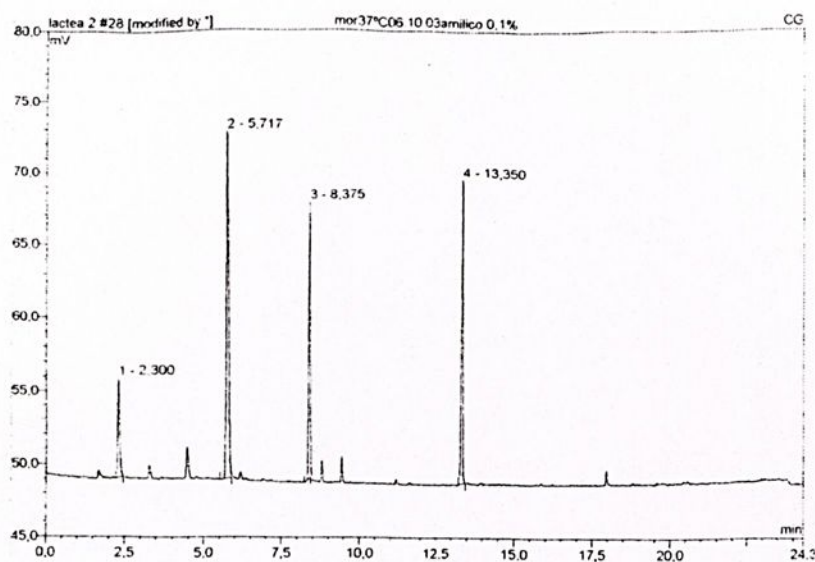
(a)



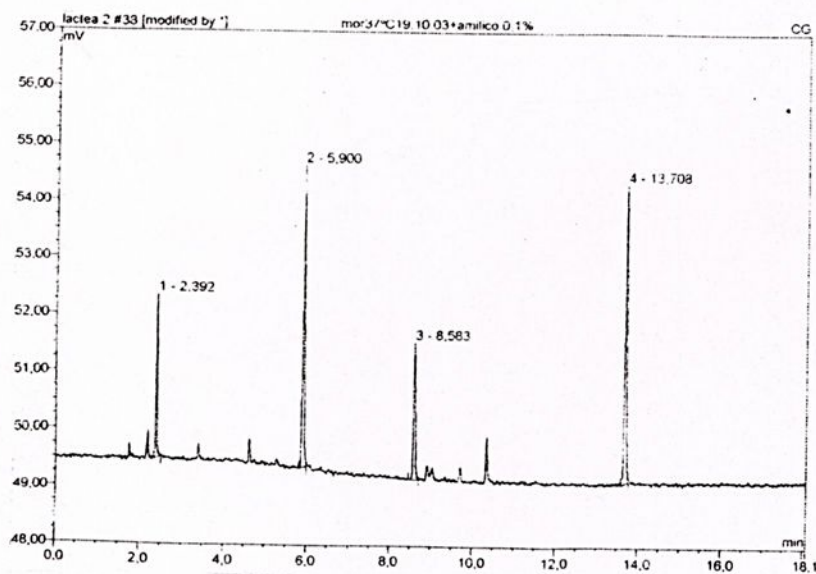
(b)

Apêndice II - Cromatogramas da bebida láctea realizados na terceira (a) e quarta (b) semanas de estocagem a 25°C.

Apêndice G - Cromatogramas da bebida láctea realizados na terceira (a) e quarta (b) semanas de estocagem a 25°C.



(a)



(b)

Apêndice H - Cromatogramas da bebida láctea realizados na primeira (a) e quinta (b) semanas de estocagem a 37°C.

