

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Tecnologia de Alimentos

**QUALIDADE E ESTABILIDADE DE
"LEITE FERMENTADO TRATADO TERMICAMENTE":
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLOGIA
E ACEITAÇÃO SENSORIAL**

Mariana Martins Macchione

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M131q Macchione, Mariana Martins
Qualidade e estabilidade de “Leite fermentado tratado termicamente”: propriedades físico-químicas, microbiologia e aceitação sensorial / Mariana Martins Macchione. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Walkiria Hanada Viotto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Leite fermentado. 2. Viscosidade. 3. Sedimentação. 4. Microbiologia. 5. Aceitação sensorial. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Quality and stability of “heat treated fermented milk”: physico-chemical properties, microbiology and sensory acceptance

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fermented milk, Viscosity, Sedimentation, Microbiology, Sensory acceptance

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Walkiria Hanada Viotto

Maricê Nogueira de Oliveira

Luciano Fachin

Salvador Massaguer Roig

Data da defesa: 29/02/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

PROFA. DRA. WALKIRIA HANADA VIOTTO
(ORIENTADORA)

PROFA. DRA. MARICÊ NOGUEIRA DE OLIVEIRA
(MEMBRO)

DR. LUCIANO FACHIN
(MEMBRO)

PROF. DR. SALVADOR MASSAGUER ROIG
(MEMBRO)

*Aos meus pais, Afonso e Eloá,
pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À professora Walkiria Hanada Viotto, pela orientação, amizade e agradável convivência que me renderam não só conhecimentos teóricos, mas um grande crescimento pessoal.

À Danisco Brasil, em especial à Luciana e Márcia, pela grande ajuda, pela utilização da planta piloto da empresa e pela doação de materiais extremamente necessário à realização do trabalho.

Aos meus pais, Afonso e Eloá, por tudo que sou, pelo respeito, amor, compreensão, carinho e incentivo.

Ao Fabiano, pela grande força e incentivo, amor e respeito, e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus irmãos Thales e Celina, pela amizade única e cumplicidade, por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida, e por acreditarem em mim.

À profa. Maricê, ao Luciano e ao prof. Salvador, pelos importantes comentários e sugestões, que muito ajudaram na melhoria do trabalho.

Ao professor Ademir Petenate, pela realização da análise estatística e pelas importantes orientações.

À Bete e Ana Lourdes, pelos ensinamentos, amizade, simpatia, pelo enorme auxílio na realização das análises, e também pelos momentos de descontração.

À Ana Patrícia e Mariana Kikuchi, pela grande amizade, ajuda na realização do trabalho e, sobretudo, por terem tornado minhas horas no laboratório mais alegres e divertidas.

Ao Aparecido, Leilane e Priscila Mamede, pela grande ajuda na realização dos processos e análises, tendo sido de grande valia para o trabalho, e pela grande amizade.

À Bernadete (Lab. Microbiologia), Dirce (Lab. Higiene), Karla (Lab. Química de Alimentos), Renata (Lab. Instrumentação) e Andréia (LRAC – FEQ), por terem me ajudado tanto na realização de algumas análises, tendo sido sempre tão solícitas, simpáticas e amigas.

À Ana Paula, dona Denir e Adaauto, pela ajuda na manutenção dos laboratórios que trabalhei, pela simpatia e amizade.

À Ana Koon (Lab. Frutas) e Alessandra (Lab. Cereais), pelo empréstimo de reagentes, boa vontade e simpatia.

Aos grandes amigos do DTA, em especial Milena, Dani, Luciene, Renata, Marina e tantos outros, por todos os bons momentos que passamos juntos.

À minha família, em especial meus avós, tios e primos, por fazerem parte da minha vida tão intensamente, pela cumplicidade e pela torcida.

À todos os amigos e amigas que fiz ao longo da vida e estarão sempre ao meu lado. Vocês são muito importantes na minha história.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

**"Qualidade e estabilidade de "leite fermentado tratado termicamente":
propriedades físico-químicas, microbiologia e aceitação sensorial"**

MACCHIONE, M.M. & VIOTTO, W. H. – Universidade Estadual de Campinas

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
Palavras chaves	xii
ABSTRACT	xiii
Key Words.....	xiv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Padrão de Identidade e Qualidade: Iogurte & "Leite Fermentado Tratado Termicamente" ...	3
2.2. Fermentação do Leite.....	5
2.3. Formação do Gel	6
2.4. Microbiologia e Atividade Enzimática	7
2.5. Pré-Tratamento do Leite.....	11
2.6. Tratamento Térmico x Pós-Acidificação	13
2.7. Sinérese e Defeitos de Textura	15
2.8. Estabilizantes	16
2.9. Pectina	18
2.10. Homogeneização e Tamanho de Partículas.....	23
2.11. Microscopia	24
2.12. Avaliação de Sabor.....	25
2.13. Embalagem	27
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	28
3.1. Ativação da cultura	28

3.2. Preparação do Iogurte Líquido	28
3.3. Análises do Leite Desnatado.....	31
3.4. Análises do Iogurte Líquido.....	31
3.4.1. Amostras	31
3.4.2. Análises Microbiológicas	31
3.4.3. Análises Físico-Químicas.....	32
3.4.4. Análise Sensorial	32
3.5. Determinação da Vida-de-Prateleira	33
3.6. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados.....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Efeito do Tratamento Térmico na Composição das Bebidas Lácteas	35
4.2. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Microbiologia das Bebidas Lácteas.....	36
4.3. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento no pH e Acidez Titulável das Bebidas Lácteas.....	38
4.4. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Estabilidade Física das Bebidas Lácteas: Sedimentação, Sinérese, Tamanho de Partículas e Viscosidade	41
4.5. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Cor das Bebidas Lácteas	49
4.6. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Avaliação Sensorial das Bebidas Lácteas: Aparência, Viscosidade, Sabor, Impressão Global e Intenção de Compra	58
5. CONCLUSÃO	68
5.1. Sugestão Para Novos Trabalhos.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO I – Ficha de Análise Sensorial.....	76
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	78
ANEXO III - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.6.1. Aumento na vida útil obtido por alguns autores, de acordo com o tratamento utilizado.....	14
Tabela 4.1.1. Efeito do tratamento térmico na composição do iogurte.....	35
Tabela 4.2.1. Análise microbiológica dos iogurtes ao longo do tempo: contagem total, bactérias lácticas e bolores e leveduras, em UFC/ml.....	36
Tabela 4.3.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para pH e acidez titulável.....	38
Tabela 4.4.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para sedimentação.....	41
Tabela 4.4.2. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para tamanho de partículas.....	43
Tabela 4.4.3. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para viscosidade.....	46
Tabela 4.5.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro L*.....	50
Tabela 4.5.2. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro a*.....	53
Tabela 4.5.3. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro b*.....	55
Tabela 4.6.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para análise sensorial: aparência, sabor e viscosidade.....	58
Tabela 4.6.2. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para análise sensorial: impressão global e intenção de compra.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.2.1. Fluxograma de processo para “leite fermentado tratado termicamente” com dois tratamentos térmicos pós fermentação e submetido a duas condições de estocagem.....	30
Figura 3.6.1. Planejamento estatístico: esquema do split-split-plot.....	34
Figura 4.3.1. Evolução do pH e acidez titulável dos iogurtes ao longo do tempo.....	39
Figura 4.4.1. Sedimentação (%) das amostras ao longo do tempo.....	42
Figura 4.4.2. Tamanho de partículas (μm) das amostras no início da vida útil e ao final do período de análise.....	43
Figura 4.4.3. Fotos tiradas no microscópio óptico, aumento de 200x; amostra 72-A, início e final da vida-de-prateleira.....	45
Figura 4.4.4. Viscosidade (cP) das amostras ao longo do tempo.....	47
Figura 4.4.5. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo na viscosidade das amostras.....	47
Figura 4.5.1. Esquema de cores do sistema CIE $L^*a^*b^*$	49
Figura 4.5.2. Evolução do parâmetro L^* ao longo do tempo para as diferentes amostras.....	51
Figura 4.5.3. Efeito da interação do tratamento térmico com o tempo no parâmetro L^*	51
Figura 4.5.4. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo no parâmetro L^* .	51
Figura 4.5.5. Evolução do parâmetro a^* ao longo do tempo para as diferentes amostras.....	54
Figura 4.5.6. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo no parâmetro a^* .	54
Figura 4.5.7. Evolução do parâmetro b^* ao longo do tempo para as diferentes amostras.....	56
Figura 4.5.8. Efeito da interação do tratamento térmico com o tempo no parâmetro b^*	56
Figura 4.5.9. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo no parâmetro b^* .	56
Figura 4.6.1. Evolução da aceitação ao longo do tempo: aparência, sabor e impressão global (escala 1 a 9); viscosidade (escala -3 a 3).....	60
Figura 4.6.2. Evolução da intenção de compra (%) ao longo do tempo (21 semanas) para cada uma das amostras.....	61
Figura 4.6.3. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo na avaliação de aparência.....	62
Figura 4.6.4. Efeitos da temperatura de estocagem e do tempo na avaliação da viscosidade.....	63
Figura 4.6.5. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo nas avaliações de sabor, impressão global e intenção de compra.....	64

RESUMO

*O iogurte é um produto necessariamente estocado e transportado sob refrigeração e por um tempo limitado. Uma alternativa para prolongar sua vida-de-prateleira consiste na aplicação de um tratamento térmico após a fermentação. O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto da intensidade do tratamento térmico pós-fermentação (75°C/15s x 110°C/4s) e da temperatura (25-30°C x 5-7°C) e tempo de estocagem (21 semanas) na qualidade e vida-útil de "leite fermentado tratado termicamente" estabilizado por pectina. Leite desnatado contendo 12% de açúcar foi tratado a 80°C/30min, e adicionado de cultura láctica (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* Yo-Mix™ 601 Lyo, Danisco Brasil) a 42-45°C até se atingir pH 4,6. Pectina (0,45% de Grindsted™ Pectin AMD 382, Danisco Brasil) foi adicionada com açúcar (2%), corante Carmim e aromatizante sabor morango. O iogurte foi tratado em trocador de calor tubular com homogeneização asséptica (15MPa e 5MPa) e envasado em fluxo laminar, em garrafas de PEAD de 500mL, com selo de alumínio, previamente irradiadas a 5kGy. A qualidade e estabilidade do iogurte foi avaliada a cada 3 semanas, através de análises microbiológicas (contagem total, bactérias lácticas e bolores e leveduras), físico-químicas (pH e acidez titulável, sedimentação e sinérese, viscosidade aparente, tamanho de partículas e cor), e sensoriais (testes de aceitação, com avaliação de aparência, sabor, viscosidade e impressão global e testes de intenção de compra, por 30 provadores não treinados). O fim da vida-de-prateleira foi determinado quando um dos atributos sensoriais atingiu média 5,0. Foi utilizado um delineamento do tipo split-split-plot com 2 blocos, resultando em 4 amostras para cada bloco. A intensidade do tratamento térmico influenciou a contagem total e de bactérias lácticas, sendo que, com o tratamento mais brando, o produto apresentou entre 100-200 UFC/ml e, com o tratamento mais intenso a contagem foi <1 UFC/ml. A temperatura de estocagem não influenciou a estabilidade microbiológica dos produtos, que mantiveram as contagens iniciais durante as 21 semanas de análise. Não houve crescimento de bolores e leveduras. A estabilidade física do produto não foi afetada pela intensidade do tratamento térmico e condições de estocagem. O único parâmetro afetado foi a viscosidade, que foi menor à temperatura ambiente (35cp x 25cp). Não houve mudanças no pH (~4,0), acidez titulável (~1,1% de ácido láctico), sedimentação (2-3%), sinérese (inexistente) e tamanho de partículas ($\leq 3,5\mu\text{m}$) devido à intensidade do*

tratamento térmico, temperatura de estocagem e tempo de armazenamento. As 3 variáveis influenciaram na avaliação do sabor e, conseqüentemente, na impressão global e intenção de compra. Os iogurtes tratados menos intensamente (72°C/15seg) receberam notas superiores durante toda a avaliação. Nos produtos refrigerados, as médias de avaliação de sabor aumentaram após a terceira semana (de 6,2 a 7,1), devido ao desaparecimento de um sabor residual formado no tratamento térmico. A temperatura de estocagem influenciou na determinação da vida-de-prateleira. Em temperatura ambiente, a vida-útil do iogurte de tratamento mais brando (72°C/15seg) foi de 15 semanas, e o de tratamento mais intenso (110°C/4seg), 9 semanas. Após 5 meses, os iogurtes mantidos sob refrigeração apresentavam médias superiores a 6,5, bastante distantes do final da vida-útil.

Palavras chaves

Leite fermentado, viscosidade, sedimentação, microbiologia, aceitação sensorial.

ABSTRACT

*Traditional yoghurt has a limited shelf-life and its storage and distribution requires refrigeration. Heat treatment after fermentation may be an alternative method to extend its shelf-life. The purpose of this study was to investigate the impact of post-fermentation heat treatment intensity (75°C/15s x 110°C/4s) and storage temperature (25-30°C x 5-7°C) and time (21 weeks) on the quality and shelf-life of "heat treated fermented milk", stabilized by pectin. Skim milk with 12% sugar was heated at 80°C/30min and 2% EPS producing starter culture (mix of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: Yo-Mix™ 601 Lyo from Danisco Brasil) was added at 42-45°C, until reaching pH 4.6. Pectin (0,45% of Grindsted™ Pectin AMD 382, from Danisco Brasil) was added with sugar (2%), Carmim colorant and strawberry flavouring. The yoghurt was treated in a tubular heat-exchanger followed by aseptic homogenization (15MPa e 5MPa), and bottled in a laminar flow, in 500mL PEAD bottles with aluminium seal, previously treated with 5kGy of gamma irradiation. The quality and stability of the fermented milks were evaluated every 3 weeks, by microbiological analyses (standard plate count, lactic acid bacteria and yeasts and moulds); physico-chemical analyses (pH and titratable acidity, sedimentation and syneresis, apparent viscosity, particle size, and color); and acceptability and buying intention tests. The end of shelf-life was determined by reaching mean value 5,0 for any sensory attribute. A split-split-plot design was applied and the results were evaluated by ANOVA. Heat treatment intensity influenced standard plate counts and lactic acid bacteria, whereas the less intensely treated products counts resulted in 100-200 UFC/mL, against <1 UFC/ml for the more intensely treated products. Storage temperature did not affect microbiological stability of the fermented milks, which maintained the same counts during the 21 weeks. No growth of moulds and yeasts was detected during the whole period, in all samples, independently of the storage temperature. Heat treatment intensity and storage condition didn't affect the physical stability of the samples, since no physical changes occurred during all the storage time. The only parameter affected was the viscosity, which was lower in ambient condition (25cp x 35cp). There were no changes in pH (4.0), acidity (1.1% lactic acid), sedimentation (2-3%), syneresis (none) and particle size ($\leq 3.5\mu\text{m}$) due to the heat treatment intensity and storage temperature and time. The 3 variables influenced the flavor evaluation and, consequently, global impression and*

buying intention. Fermented milks treated less intensely (72°C/15s) had higher mean values during the whole period of evaluation. Mean values for flavor increased after the 3rd week of refrigerated storage (6.2 to 7.1), due to disappearance of an off-flavor originated from heat treatment. Storage temperature influenced the shelf-life determination. At ambient temperature, shelf-life was 3 months and a half for fermented milk treated at 72°C/15s; fermented milks treated at 110°C/4s had a shelf-life of 2 months. After 5 months, fermented milks kept under refrigeration showed sensory mean values higher than 6.5, far away from the end of shelf-life.

Key Words

Fermented milk, viscosity, sedimentation, microbiology, sensory acceptance.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os últimos anos impactaram de forma muito significativa o setor de lácteos, devido a mudanças nos hábitos de consumo e exigências dos consumidores, tornando-o um dos mais dinâmicos e inovadores do setor de alimentos, com previsão de grande centralização de investimentos nos próximos anos (MILKPOINT, 2004b).

Segundo AC Nielsen (2005), em 2004, o valor mundial das vendas de Alimentos & Bebidas cresceu 4% em comparação ao ano anterior. Das 89 categorias estudadas, a de Iogurtes Líquidos foi a que apresentou o segundo maior crescimento, com expansão de 19% nas vendas, perdendo apenas para a categoria de Bebidas à Base de Soja. Além da procura por produtos saudáveis, uma forte tendência é a necessidade de praticidade do consumidor. Com o ritmo de vida cada vez mais rápido, consumidores estão procurando por produtos mais convenientes. Dessa forma, produtos com baixo teor de gordura, por exemplo, e baseados em conveniência devem crescer ainda mais (MILKPOINT, 2004b).

No Brasil, o iogurte transformou-se em ícone nos primeiros anos do Real. Até então consumido no país basicamente pelas classes A e B, a estabilidade econômica trouxe ao mercado mais de 12 milhões de novos consumidores vindos das classes C e D. (MILKNET, 2004b). O consumo per capita anual de iogurte, que era de 0,363 litro em 1974-1975, subiu para 2,91 litros em 2002-2003 (MILKNET, 2004a). O mercado total de lácteos frescos, incluindo iogurtes, sobremesas, petit e leite fermentado, movimentou 546 milhões de toneladas e R\$ 2,5 bilhões em 2004 (MILKNET, 2005).

As companhias de alimentos e bebidas que desenvolvem produtos saudáveis e que também agradam o consumidor com um bom sabor e com conveniência encontrarão um mercado receptivo a esses produtos. Somente aquelas melhorias adequadas às demandas mais sustentáveis dos consumidores, particularmente saúde e conveniência, terão sucesso em longo prazo (MILKPOINT, 2005).

O iogurte é um produto considerado por especialistas como um alimento com um bom equilíbrio entre proteínas, carboidratos e cálcio (MILKPOINT, 2004a). As proteínas do leite e, conseqüentemente, do iogurte, são de excelente qualidade biológica, sendo, tanto as caseínas quanto as proteínas do soro, bem dotadas de aminoácidos essenciais (TAMIME & ROBINSON, 2000). Além disso, os produtos lácteos representam uma forma fácil de consumir cálcio, bastante carente na maioria das dietas. Aproximadamente 90% das mulheres adultas e 73% dos homens não alcançam as recomendações diárias. Pesquisas têm continuamente mostrado o benefício efetivo de uma dieta rica em cálcio na

prevenção da osteoporose, hipertensão, câncer de cólon e obesidade (BILLETDOUX *et al*, 2004). Cook & Friday (2003) reportaram que o leite, queijo e iogurte juntos contribuem com 42% do total do cálcio consumido nas dietas.

O iogurte produzido de acordo com o processo convencional pode ser estocado e transportado apenas sob refrigeração e por um tempo limitado. Os principais problemas que limitam a sua vida-de-prateleira são a pós-acidificação, a sinérese e a formação de bolores e leveduras. Uma alternativa para prolongar a vida-de-prateleira consiste no tratamento térmico após a fermentação, sendo o produto resultante referido como "leite fermentado tratado termicamente" (FAO/WHO, 2003) ou "bebida láctea tratada termicamente após a fermentação" (Brasil, 2005).

O aquecimento em pH baixo (4,0 – 4,6) deve ser efetivo para destruir o fermento láctico e reduzir a contagem de microorganismos contaminantes como bolores e leveduras. Com a inativação das bactérias lácticas, não há produção de ácido durante o armazenamento, evitando a pós-acidificação do produto, um dos principais parâmetros que determinam o fim da vida útil do iogurte. Além disto, ao se evitar uma queda excessiva no pH durante a estocagem, também se evita ou se reduz a sinérese. A redução de microorganismos contaminantes também contribui para a melhoria da qualidade e aumento da vida de prateleira do iogurte. Para evitar a contaminação, proveniente do ambiente, durante o envase, pode ser utilizado um envase em condições assépticas após o resfriamento da bebida láctea.

A utilização de estabilizantes, porém, é praticamente obrigatória para prevenir alterações na textura e na viscosidade provocadas pelo aquecimento após a fermentação ($\text{pH} \leq \text{pI}$ da caseína), devido à instabilidade térmica das proteínas do leite. O tratamento térmico em pH baixo pode causar a formação de grumos e sinérese do produto por desestabilização do sistema, modificando a microestrutura do iogurte (SPEER, 1998; STAFF, 1998).

O tratamento térmico do leite fermentado possibilita a utilização de novos canais de distribuição, a abertura de novos mercados e ainda a possibilidade de se prescindir da cadeia de frio na distribuição e estocagem, sendo bastante adequado em áreas geográficas onde a refrigeração no ponto de venda for ineficiente ou ausente, ou mesmo para ser transportado pelo consumidor.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da intensidade do tratamento térmico e da temperatura de estocagem na qualidade e vida-útil do "leite fermentado tratado termicamente". A avaliação periódica dos principais fatores que limitam a vida-de-

prateleira, como acidez, sedimentação, sinérese, viscosidade aparente e qualidade microbiológica, foi realizada durante o período de estocagem. Testes de aceitação sensorial, com avaliação da aparência, viscosidade, sabor e impressão global, além da intenção de compra, foram realizados para os diferentes produtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Padrão de Identidade e Qualidade: Iogurte & "Leite Fermentado Tratado Termicamente"

Os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados" definem iogurte como o produto cuja fermentação se realiza com cultivos proto-simbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final. Os fermentos lácticos aludidos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2000).

O número mínimo estabelecido de bactérias lácticas viáveis durante a vida de prateleira do iogurte é diferente em cada país. Suíça e Itália estabelecem um limite de 10^6 UFC/ml, o Japão estabelece 10^7 UFC/ml, em Portugal o limite é de 10^8 UFC/ml na França e Espanha, 5×10^8 UFC/ml. O Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2003) estabelece contagem total mínima de 10^7 UFC/ml, sendo 10^6 UFC/ml de bactérias do iogurte. As normas técnicas de identidade e qualidade de leites fermentados do Mercosul estabelecem 10^7 UFC/ml de bactérias lácticas viáveis durante toda a vida de prateleira do iogurte (BIROLLO *et al.*, 2000).

Segundo Helferich & Westhoff (1980), um iogurte recém-fabricado contém cerca de 1 bilhão (10^9) de bactérias por grama. Durante a estocagem refrigerada, grande parte ou todo o *S. thermophilus* morre devido ao ambiente ácido.

Conforme Kosikowski (1977), o produto tratado termicamente não deve receber a mesma denominação do iogurte tradicional. Para Williams (1992), se o fabricante optar pelo tratamento térmico após a fermentação, a rotulagem deve mencionar "tratado termicamente após a fermentação". Se o iogurte contiver bactérias vivas, a rotulagem pode mencionar "culturas ativas de iogurte" ou "contém culturas ativas". Isso não deve

ser confundido com a descrição "preparado com culturas ativas", uma vez que todos os iogurtes são feitos desta maneira, mas somente os iogurtes que não são tratados termicamente após a fermentação apresentarão microorganismos viáveis. De acordo com normas de rotulagem britânicas, se o iogurte receber um tratamento térmico (aquecimento) após a fermentação, deve receber a descrição, no nome, de pasteurizado, de vida estendida, UHT ou esterilizado (UK-DTF, 1983). O Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2003), recomenda que produtos obtidos da fermentação do leite, com ou sem coagulação, seguido de tratamento térmico, sejam denominados como "leite fermentado tratado termicamente".

Pela Legislação Brasileira, o "leite fermentado tratado termicamente" encontrou uma classificação após a vigência da Instrução Normativa nº16, de 23 de agosto de 2005, que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Por esta instrução, o produto é classificado como "bebida láctea tratada termicamente após fermentação" que, pela definição, é a bebida láctea adicionada de cultivo de microrganismos ou de produtos lácteos fermentados e posteriormente submetido a tratamento térmico adequado. Quando em sua elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos e cuja base láctea represente pelo menos 51% (m/m), o produto classifica-se como "bebida láctea tratada termicamente após fermentação com adição". No caso em que os ingredientes opcionais sejam exclusivamente açúcares, acompanhados ou não de glicídios (exceto polissacarídeos e poliálcoois) e/ou amidos ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou se adicionam substâncias aromatizantes/saborizantes, classificam-se como "bebida(s) láctea(s) tratada(s) termicamente após fermentação(s) com açúcar, açúcarada(s) ou adoçada(s) e/ou aromatizada(s)/saborizada(s)" (BRASIL, 2005).

Bebidas acidificadas de diversos tipos, como iogurtes líquidos, bebidas lácteas com frutas, bebidas com soja, bebidas com soro, kefir, etc são produtos existentes no mundo todo. Geralmente consistem de um sistema protéico acidificado, resultado de uma base ácida (leite fermentado) ou uma base neutra (leite, leite de soja) adicionada de ingredientes ácidos (polpa ou concentrado de frutas), com estabilidade e viscosidade próximas ao do leite *in natura* (LAURENT & BOULENGUER, 2003).

Bebidas lácteas fermentadas, especificamente, são muito populares no Japão, sudeste da Ásia e Holanda. São normalmente produzidas pela fermentação do leite por uma cultura láctica, seguida de homogeneização e adição ou não de suco de frutas. O tratamento térmico do produto final e a temperatura de estocagem têm grande influência

na estabilidade física, além de outras propriedades como a cor, sabor e a estabilidade microbiológica. Na prática, o tratamento térmico, seguido de enchimento asséptico, é necessário para que se tenha uma bebida láctea de vida estendida, enquanto que baixas temperaturas de estocagem são necessárias para estender a vida-de-prateleira de bebidas não tratadas termicamente (LUCEY et al., 1999).

Devido ao baixo pH, o produto resultante pode apresentar defeitos, tais como sedimentação e separação de soro (LUCEY et al., 1999). Tanto a qualidade do iogurte, em termos de textura e estabilidade, quanto a consistência são importantes fatores para a aceitação do consumidor. As propriedades da bebida láctea são determinadas pela estrutura do gel, que depende de fatores como a composição do leite, a cultura utilizada e as condições de processamento (DUGGAN & WAGHORNE, 2003).

2.2. Fermentação do Leite

O iogurte é o produto resultante da fermentação do leite por bactérias lácticas termofílicas, que consistem em uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, cuja temperatura de incubação fica em torno de 40 - 45°C, e o tempo de processo por volta de 3 - 6 horas (LUCEY, 2004; LEE & LUCEY, 2004). Durante a fermentação, a lactose é metabolizada em ácido láctico, proteínas são hidrolisadas por proteinases bacterianas, o ambiente iônico se altera, ocorrendo um aumento na biomassa (LUCEY & SINGH, 1998).

Quando *Streptococci* e *Lactobacilli* são associados na fermentação do leite, o tempo de coagulação é menor que no crescimento das culturas separadamente. No início da fermentação, o ácido láctico é produzido principalmente pelos *Streptococci*. Estes crescem mais rápido e liberam CO₂ e ácido fórmico, que estimulam o crescimento dos *Lactobacilli*, que iniciam a proteólise da caseína, liberando peptídeos e aminoácidos úteis para o crescimento dos *Streptococci*. Numa segunda etapa, a produção de ácido é realizada principalmente pelos *Lactobacilli*. Na última etapa, o crescimento dos *Streptococci* é reduzido devido ao efeito adverso do ácido láctico, de tal forma que a contagem dos *Lactobacilli* gradualmente se aproxima àquela dos *Streptococci* (RĂSIĆ & KURMANN, 1978).

A produção de ácido pelas bactérias lácticas resulta em certo grau de tamponamento por volta do pH 5,0, devido ao efeito do próprio ácido láctico. Esse

tamponamento ajuda a diminuir a velocidade de queda do pH, porém, como as bactérias encontram-se na fase de crescimento acelerado, o pH continua a cair, até que se inicie uma inibição das bactérias pelo baixo pH (normalmente em pHs abaixo de 4,8, mas isso depende do tipo e cepa da bactéria) (LUCEY, 2004).

O resfriamento do gel deve se iniciar quando se atinge o pH apropriado, com base no pH que se pretende atingir. Dependendo da taxa de resfriamento, a produção de ácido continua, sendo necessário que a refrigeração se inicie em pHs mais altos que o desejado para o produto final (LUCEY, 2004).

2.3. Formação do Gel

As caseínas constituem aproximadamente 80% da proteína do leite e são compostas por 4 tipos principais (α_{s1} : α_{s2} : β : κ), em combinação com fosfato de cálcio coloidal (FCC), na forma de agregados de caseína, denominados de micelas (LUCEY, 2002). O modelo de micela mais citado atualmente sugere uma estrutura complexa relativamente grande, aproximadamente esférica, com um diâmetro na faixa de 20 a 600 nm (LUCEY & SINGH, 1998). As frações de caseína estariam organizadas dentro da micela de acordo com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos; a fração κ -caseína, que é a mais hidrofílica, apresenta a extremidade C-terminal como "fios de cabelo" localizados na parte externa da micela. A estabilidade contra a agregação se dá basicamente devido à repulsão estérica, causada pelos "fios de cabelo" da κ -caseína (WALSTRA, 1990), e da repulsão eletrostática, causada pelo excesso de cargas negativas das micelas no pH normal do leite (6,6 – 6,8). O fosfato de cálcio coloidal é a unidade que mantém a estrutura das micelas, agindo como uma ponte neutralizadora entre dois grupos fosfoseril negativamente carregados (LUCEY, 2004).

A acidificação do leite durante a fermentação faz com que o fosfato de cálcio coloidal se dissolva, resultando na liberação de moléculas de caseína, desestabilizando as micelas (DUGGAN & WAGHORNE, 2003) à medida em que o pH se aproxima do ponto isoelétrico, onde esta apresenta menor solubilidade (WALSTRA, 1990). Além disso, o abaixamento do pH de 6,6 (típico do leite) a próximo de 4,6 (ponto isoelétrico das caseínas), resulta em uma diminuição nas cargas da superfície das caseínas (potencial zeta) em relação à carga original, altamente negativa, aumentando a atração entre as moléculas (LEE & LUCEY, 2004; LUCEY, 2004). Isso permite uma aproximação e

agregação das moléculas de caseína, através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (LUCEY, 2004), resultando na formação de uma rede tridimensional, que armadilha o soro (DUGGAN & WAGHORNE, 2003).

2.4. Microbiologia e Atividade Enzimática

Assim como todos os outros alimentos de origem animal ou vegetal, o leite contém diversas enzimas como parte de sua composição. O leite cru contém cerca de cinquenta a sessenta tipos diferentes de enzimas naturalmente presentes, principalmente proteases e lipases. Os principais constituintes do leite (proteínas, lipídeos e lactose) podem ser modificados por essas enzimas, causando diversas alterações (FOX & McSWEENEY, 1998; CHEN *et al.*, 2003).

Com poucas exceções, as enzimas presentes no leite não apresentam efeito benéfico às qualidades nutricionais e organolépticas e, portanto, sua destruição pelo aquecimento é um dos objetivos na maioria dos processamentos de produtos lácteos (FOX & McSWEENEY, 1998). O termo inativação significa que uma enzima foi quimicamente modificada, de tal forma que não mais consiga atuar como um catalisador. A inativação de algumas das moléculas resulta em diminuição da atividade enzimática, o que também pode ocorrer quando alguma alteração afeta suas condições de ação (como inibidores, co-fatores, temperatura, etc) (WALSTRA *et al.*, 2006).

Tratamento térmico geralmente causa a inativação enzimática, através da desnaturação resultante do desdobramento da molécula. A taxa de inativação pelo tratamento térmico pode depender fortemente de condições como pH e a presença ou ausência de substrato (WALSTRA *et al.*, 2006). Tratamentos térmicos severos resultam na alteração estrutural do substrato, devido à interação da caseína com as proteínas do soro, reduzindo a acessibilidade de enzimas que atacam a caseína (CHEN *et al.*, 2003). A homogeneização raramente tem efeito significativo na inativação enzimática (WALSTRA *et al.*, 2006).

Enzimas capazes de hidrolisar cadeias peptídicas são conhecidas como peptidases, proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas, sendo peptidases o termo mais geral. Proteinases são enzimas proteolíticas que atuam internamente na cadeia polipeptídica, ao invés da hidrólise de um peptídeo ou dipeptídeo da extremidade da cadeia. As proteinases

são classificadas em 4 sub-grupos, de acordo com o seu mecanismo de ação: serina, cisteína, aspártica (ou ácida) e metalo-proteinase (CHEN *et al.*, 2003).

São três os mecanismos pelos quais o aquecimento causa a perda de atividade de proteinases. Em primeiro, através do desdobramento das cadeias, resultando em desnaturação; em segundo, pela promoção da auto-digestão das proteinases (auto-proteólise); e em terceiro, por alterações covalentes, não enzimáticas e irreversíveis, como por exemplo, deamidação. A redução na atividade proteolítica no leite também pode ocorrer a temperaturas mais baixas (55-60°C) devido à formação de agregados enzima-caseína, diminuindo a disponibilidade da enzima e do substrato (CHEN *et al.*, 2003).

As enzimas naturais ou nativas do leite são aquelas excretadas pela glândula mamária ou presente nos leucócitos (WALSTRA *et al.*, 2006). Duas proteinases, em particular, têm sido estudadas em detalhes: proteinase alcalina do leite (plasmina) e proteinase ácida do leite (catepsina D) (FOX & MCSWEENEY, 1998; CHEN *et al.*, 2003). Tratam-se de duas endopeptidases com ação tipo tripsina, capazes de causar sabor amargo e solubilização das caseínas, e resultando, às vezes, na gelificação do leite (WALSTRA *et al.*, 2006).

A plasmina possui atividade ótima em pH 7,5 e 35°C. É capaz de atuar numa faixa de pH de 4,0 a 9,0, chegando a atingir cerca de 20% de sua atividade a 5°C. No leite, a plasmina e seus ativadores estão associados às micelas de caseína, se dissociando completamente quando o pH atinge 4,6. É uma enzima relativamente estável ao calor, sendo parcialmente inativada na pasteurização rápida (72°C/15s), mas com aumento da atividade devido à inativação de seus inibidores. Resiste parcialmente ao tratamento UHT e é inativada em aquecimento a 80°C/10min em pH 6,8; sua estabilidade aumenta com a diminuição do pH, na faixa de 9,2 a 3,5 (WALSTRA *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2003; FOX & MCSWEENEY, 1998).

A catepsina D é uma proteinase ácida, com pH ótimo de aproximadamente 4,0. Sua atividade é também associada às caseínas, sendo capaz de degradar todas as proteínas do leite, exceto a β -lactoglobulina. É menos resistente termicamente que a plasmina, sendo inativada a 70°C/10min e a 65°C/30min em leite desnatado. Devido à essa baixa estabilidade, a catepsina D não tem representado grande importância em leite pasteurizado e produtos lácteos. Entretanto, foi sugerido recentemente que a atividade derivada da procatepsina D (a proenzima da catepsina D) pode contribuir com a proteólise em produtos lácteos pasteurizados (WALSTRA *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2003; FOX & MCSWEENEY, 1998).

Outra origem de enzimas são os microrganismos. O uso de bactérias para a fermentação e a contaminação que pode ocorrer durante estocagem e processamento elevam o número dessas enzimas (CHEN *et al.*, 2003). As enzimas proteolíticas bacterianas podem estar situadas no interior das células (intracelular), associadas à parede celular (periplásmica) ou serem excretadas diretamente no meio (extracelular). As enzimas associadas à célula são liberadas no leite com a morte e lise das células durante o tratamento térmico (WALSTRA *et al.*, 2006; FOX & McSWEENEY, 1998; KOHLMANN *et al.*, 1991).

Muitas enzimas sobrevivem aos processos térmicos aplicados na produção de leite e derivados. Enzimas termoestáveis, nativas ou de origem bacteriana, capazes de sobreviver, podem causar, durante a estocagem, o desenvolvimento de defeitos geralmente relacionados à quebra de proteínas (VALERO *et al.*, 2001).

As principais fontes de contaminação bacteriana do leite cru são geralmente o interior do úbere e os tetos, a ordenha e os equipamentos de estocagem. Os contaminantes são normalmente psicrotróficos, ou seja, microrganismos mesófilos ou termófilos capazes de crescer sob baixas temperaturas (CHEN *et al.*, 2003). Enzimas de psicrotróficos podem ser capazes de sobreviver à pasteurização, ao tratamento UHT e à inativação a baixa temperatura (KOHLMANN *et al.*, 1991).

Indicativos de qualidade de produtos lácteos geralmente se relacionam a contagens microbianas, de termófilos e mesófilos termodúricos (CHEN *et al.*, 2003). Os esporos bacterianos são a forma mais termoestáveis dos microrganismos, sendo bastante difundidos no ambiente, o que os torna de grande importância em produtos alimentícios, como o leite, que recebem tratamentos térmicos severos para prolongar sua vida-de-prateleira (BLAKE & WEIMER, 1997). Entretanto, a ausência de bactérias em um produto não significa que suas enzimas não estão ativas no produto. Ao contrário, a presença de bactérias viáveis nos produtos também não significa suas enzimas sejam capaz de deteriorar o produto. Dessa forma, a contagem bacteriana talvez seja um parâmetro menos relevante para a qualidade do produto que a quantidade de enzimas (CHEN *et al.*, 2003).

Dessa forma, a destruição de esporos termo resistentes não deve ser a única preocupação na fabricação de produtos lácteos “estéreis”, já que suas proteases podem causar diversas alterações na textura e sabor dos produtos finais. A intensidade dos tratamentos térmicos é limitada pelos efeitos adversos que o aquecimento pode causar ao produto. Tratamentos térmicos suficientemente severos para eliminar a atividade

proteolítica causariam danos à funcionalidade das proteínas. Dessa forma, a destruição dessas enzimas se torna impraticável e a função da esterilização UHT é prejudicada, resultando em desenvolvimento de sabor amargo devido à ação das proteases termo resistentes (CHEN *et al.*, 2003; CHOPRA & MATHUR, 1983).

Nas condições de processamento utilizadas atualmente na indústria de lácteos (tratamentos térmicos mais intensos e menor nível de contaminação pós-tratamento), os microrganismos psicrotróficos e termodúricos, particularmente *Bacillus* e *Pseudomonas*, são os principais responsáveis pela determinação da vida-de-prateleira do leite e produtos lácteos durante estocagens mais prolongadas, por serem capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C (CHEN *et al.*, 2003; GARCÍA-ARRESTO & SUTHERLAND, 1997).

Espécies de *Pseudomonas* psicrotróficas não sobrevivem a tratamentos térmicos como LTLT, HTST ou UHT. Em contrapartida, a maioria das bactérias mesófilas e termófilas termodúricas (a maioria espécies de *Bacillus*) podem suportar tais tratamentos. Espécies termodúricas são aquelas capazes de sobreviver a tratamentos térmicos superiores a 63°C/30min. Por esse motivo essas bactérias foram por muitos anos utilizadas como indicativo da qualidade do leite UHT. Dentre as bactérias psicrotróficas e termodúricas isoladas do leite cru foi detectado que 86% eram espécies de *Bacillus* (CHEN *et al.*, 2003).

As espécies de *Bacillus* são largamente distribuídas no ambiente, podendo ser introduzidas no leite e derivados durante o manuseio e produção. Um problema adicional com as espécies de *Bacillus* é que eles esporulam durante o processamento, sendo seus esporos muito resistentes ao aquecimento. Além disso, essas espécies são capazes de produzir atividade proteolítica mais diversificada que as espécies de *Pseudomonas*, sendo que muitas delas produzem mais de um tipo de proteinase (CHEN *et al.*, 2003).

Não é necessária uma população muito grande de psicrotróficos para a produção de quantidades significativas de proteases termo resistentes. O leite chega a ser mantido por 3-4 dias sob refrigeração antes de ser processado, tempo suficiente para que a contagem de psicrotróficos no leite cru atinja 10^3 a 10^6 UFC/ml. As enzimas associadas às células podem ser produzidas logo no início do ciclo de crescimento bacteriano, enquanto que a produção de enzimas extracelulares começa a ocorrer quando os nutrientes do meio começam a se tornar limitados, no final da fase *log* ou início da fase estacionária (KOHLMANN *et al.*, 1991).

O pH ótimo de proteases produzidas por *B.stearothermophilus* é de aproximadamente 8,0, podendo variar bastante entre as diferentes espécies de *Bacillus*, tendo sido encontrado valores ótimos de 6,9 até 12,0. A temperatura ótima para ambas as enzimas foi de 70°C (CHOPRA & MATHUR, 1983).

A maioria das espécies de *Pseudomonas* produzem um tipo de proteinase com pH ótimo entre 6,5 e 8,0. Culturas de *P. fluorescens* e *P. fragi* isoladas do leite apresentaram atividade proteolítica numa faixa de temperatura de 7 a 52°C, sendo a temperatura ótima de ambas próxima a 37°C, e em ampla faixa de pH (5,0 a 9,0), sendo o ótimo entre 6,5 e 8,0. As enzimas retiveram mais de 70% de sua atividade após tratamento a 72°C/16s e mais de 40% da atividade após tratamento a 140°C/16s. Outras proteinases de espécies de *Pseudomonas* isoladas do leite cru retiveram 55-65% da sua atividade após um tratamento térmico de 77°C/17s e 20-40% após tratamento de 140°C/5s, ambas em tampão pH 7,0. Além disso, proteinases produzidas por 10 diferentes isolados de *Pseudomonas* sobreviveram a um tratamento de 149°C/10s em tampão pH 7,5. Soluções de proteinase de culturas de *B. stearothermophilus* e *B. licheniformis* não mostraram diminuição da atividade após tratamento a 70°C/10min em pH 7,0 (CHEN *et al.*, 2003).

2.5. Pré-Tratamento do Leite

O uso de um tratamento térmico no leite tem como objetivos principais a destruição dos microrganismos e inativação enzimática, redução do oxigênio dissolvido, já que as bactérias lácticas são sensíveis ao oxigênio, destruição de alguns inibidores e produção de alguns compostos estimuladores, além da desnaturação das proteínas do soro (LUCEY, 2004), que ocorre em temperaturas acima de 70°C (LEE & LUCEY, 2004; LUCEY *et al.*, 1998b).

As proteínas do soro desnaturadas (β -lactoglobulina principalmente) são capazes de interagir com a κ -caseína na superfície das micelas, através de interações hidrofóbicas e ligações dissulfídicas intermoleculares (LEE & LUCEY, 2004; LUCEY *et al.*, 1998b). Essa interação ajuda na formação de ligações cruzadas entre as micelas de caseína, fortalecendo a rede, o que resulta em um aumento da rigidez e elevação do pH de gelificação (LUCEY, 2002).

Tratamentos severos (acima de 78°C/15min) resultam em desnaturação suficiente para causar uma grande mudança nas propriedades de gelificação (LUCEY, 2004). Além

das proteínas do soro desnaturadas, associadas com micelas de caseína, atuarem como material ligante para a interação com outras proteínas, elas também atuam no sentido de reduzir as cargas repulsivas entre as micelas. Desta forma, o número de ligações entre as moléculas de proteínas aumenta e a concentração de proteína gelificada aumenta através da participação das proteínas desnaturadas do soro na estrutura do gel (LUCEY & SINGH, 1998). Os interstícios da rede protéica diminuem, aumentando a capacidade de ligar água e influenciando nas propriedades mecânicas do gel (BROOKER, 1987), resultando em géis mais firmes e viscosos (LUCEY, 2004).

Diversos binômios tempo x temperatura têm sido utilizados no leite para a produção do iogurte, os quais normalmente variam entre 80 - 85°C por 30 minutos ou mais, ou 90 - 98°C por 7 minutos ou mais (LUCEY, 2004).

A β -lactoglobulina, principal proteína do soro, possui um ponto isoeletrico mais alto que o das caseínas (pH 5,3), fazendo com que a gelificação ocorra a pHs mais elevados. A associação das proteínas do soro desnaturadas às micelas de caseína ocorre durante o próprio tratamento térmico ou durante o processo de acidificação. As proteínas do soro desnaturadas no leite aquecido são insolúveis no pH 4,6 e se precipitam sobre as caseínas (LUCEY, 2004).

Em pHs abaixo de 5,0, a firmeza do gel aumenta consideravelmente, sendo máxima em pHs próximo ao ponto isoeletrico, e aumentando ainda mais com o tempo. Rearranjos nas moléculas de caseína ocorrem antes, durante e após a formação do gel, de maneira dinâmica, devido a mudanças na força e tipo de interações entre caseínas com a diminuição do pH. A fusão das partículas de caseína ocorre durante e depois da formação do gel (LUCEY, 2004).

Lucey *et al.* (1999) testaram diferentes temperaturas de pré-aquecimento do leite (72 a 93°C por 30 minutos) e não observaram diferenças na estabilidade coloidal dos produtos resultantes. Em contrapartida, Sedlmeyer *et al.* (2004) mostraram que um pré-aquecimento intenso do leite aumentou a estabilidade de bebidas lácteas fermentadas homogêneas. O pré-aquecimento permitiu a interação das proteínas do soro na rede caseica sem a necessidade de uso de hidrocolóides. Em sistemas não pré-aquecidos, os grupos SH das proteínas se tornam expostos durante a pasteurização e homogeneização, resultando em precipitação. Dessa forma, a natureza das proteínas também pode ser um fator importante na estabilização (SEDLMEYER *et al.*, 2004).

2.6. Tratamento Térmico x Pós-Acidificação

A reclamação de consumidores com relação à acidez excessiva é geralmente indicativa de pós-acidificação de bactérias lácticas devido a abusos na temperatura em algum momento na cadeia de frio (ROBINSON, 2000). Alguns mercados, por exemplo, mantêm o iogurte a aproximadamente 15 °C. Nesta temperatura muitas enzimas estão ativas, mesmo que em menor intensidade (BIANCHI-SALVADORI, 1998).

A pós-acidificação do iogurte confere um sabor ácido e às vezes amargo, reduzindo a qualidade do iogurte e estabelecendo o fim da vida útil. Mesmo quando o iogurte natural é mantido a 4 °C, a acidez titulável aumenta, apesar da ausência de crescimento bacteriano (KOSIKOWSKI, 1977). Um tratamento térmico posterior à fermentação favorece o prolongamento da vida útil, uma vez que sua aplicação reduz a atividade das bactérias lácticas e suas enzimas, assim como outros contaminantes como bolores e leveduras (WAES, 1987).

No contexto industrial, seriam requeridas condições que resultem em um efeito de pasteurização similares àsquelas utilizadas para o leite, ou seja, 72-75°C por 15 a 30 segundos. Tem sido reportado que, para o caso do leite fermentado, um tempo ou temperatura menor pode ser necessário, devido ao pH mais baixo comparado com o leite (SPEER, 1998).

Com relação à vida-de-prateleira os resultados são difíceis de serem comparados em função dos diferentes tipos de iogurtes processados, das condições de processo, do pH e da ocorrência de contaminação durante o envase. A Tabela 2.6.1, reproduzida de Tamime & Robinson (2000), mostra o incremento na vida útil do produto obtido em diferentes trabalhos.

Tabela 2.6.1. Aumento na vida útil obtido por alguns autores*, de acordo com o tratamento utilizado.

Temperaturas (°C)	Tempos	Incremento na vida útil
50 – 55	30 min	3 semanas a 15°C
57 – 70	15 – 40 seg	Redução na contagem de microrganismos indesejáveis
58 – 60	20 – 30 min	Inativação da β -galactosidase
58	5 min	Inativação de leveduras
60 – 65		40 dias a 6-8°C 10 dias a 15-20°C
60 – 65		6 – 8 semanas a 12°C
60	30 min	30 dias a 20°C
60 ou 70	1 min	
60 – 68 depois 77	5 – 20 min	Iogurte asséptico
64	5 min	3 semanas a 20°C
65	30 seg	
65 – 70	Flash	Envase a quente
65	20 min	7 dias a 27°C
70	5 min	21 dias a 5°C
70	30 – 40 seg	Envase a quente
70	15 – 30 min	30 dias a 20°C 60 dias a 4°C
75	Poucos segundos	4 – 6 semanas a 20°C
85	2 min	Armazenamento não refrigerado
85	20 seg	3 meses a 37°C
85 – 88	10 – 15 min	1 ano a 20°C
85	27 seg	> 4 semanas a 20°C
88		Algumas semanas

* Informações reproduzidas de Tamime & Robinson (2000).

2.7. Sinérese e Defeitos de Textura

O corpo e textura da maioria dos produtos fermentados deve ser macio, uniforme e sem grânulos ou grumos. Três exemplos de defeitos de textura em produtos fermentados incluem pouco corpo, sinérese e formação de grumos (LUCEY, 2004).

A perda de corpo normalmente ocorre devido à baixa concentração de sólidos, concentração insuficiente de estabilizante, desnaturação protéica insuficiente durante o tratamento térmico, temperaturas elevadas de incubação, quebra excessiva da estrutura durante operações como mistura, batimento, bombeamento e envase (LUCEY, 2004).

A sinérese e separação do soro têm um papel importante na qualidade do produto e sua aceitação pelo consumidor (LEE & LUCEY, 2004). Separação de soro pode ser definida como o aparecimento de soro na superfície do gel; sinérese é o encolhimento do gel, que leva à separação do soro (LUCEY, 2004). A sinérese é causada, na maior parte, pelo rearranjo da rede protéica, através de um aumento de interações entre as micelas e da contração do gel, que causa uma diminuição na capacidade do gel de reter toda a água inicialmente "armadilhada", resultando na expulsão de líquido ou separação de soro (LUCEY, 2002; WALSTRA et al., 1999). A sinérese, no iogurte tradicional, pode ser resultado do uso de altas temperaturas de incubação, concentração excessiva de proteínas do soro em relação às caseínas, baixa concentração de sólidos e manuseio físico excessivo durante o armazenamento e distribuição (LUCEY, 2004).

Algumas variações no processo também podem causar alterações na textura do produto, como alterações na temperatura e tempo de incubação, o pH de resfriamento, a atividade proteolítica bacteriana, o uso de estabilizantes, o uso culturas *starters* com produção de EPS (LUCEY, 2004).

No caso da produção de "leite fermentado tratado termicamente", os principais defeitos estão relacionados com o aquecimento das proteínas em pH baixo (próximo ao ponto isoelétrico da caseína). O iogurte é relativamente estável em pH menor que 4,6, pois as micelas de caseína apresentam uma carga superficial positiva fraca, o que gera uma certa repulsão eletrostática. Esta repulsão pode ser facilmente superada se a energia adicionada ao sistema for elevada, podendo ocorrer agregação e precipitação de proteínas, conferindo uma textura arenosa ao produto (GRINDSTED..., 1991; STABILISERS..., 1992).

O aparecimento de grumos ou grânulos é resultado da formação de grandes agregados de proteínas, com dimensões de 1 a 5 mm, chegando a causar a rejeição do

produto pelo consumidor, já que estes esperam um produto de textura fina e macia. Batimento, homogeneização a baixa pressão ou passagem do produto por um filtro ou peneira são técnicas usadas para diminuir o tamanho dos grumos e aumentar a maciez e cremosidade (LUCEY, 2004).

Certas medidas são necessárias para tornar o gel de caseína acidificado resistente ao calor, uma vez que ele se contrai na presença de calor, resultando na perda de soro. A sinérese pode ser reduzida, por exemplo, pelo aumento do conteúdo protéico do leite, pela redução da temperatura de incubação e taxa de acidificação, ou pela adição de estabilizantes que interajam com a rede de caseína (EVERETT & McLEOD, 2005).

A adição de hidrocolóides visa garantir a estabilidade da rede protéica antes da pasteurização, evitando a formação de grumos e precipitado (aspecto arenoso) no aquecimento, além de sinérese e separação de soro durante a estocagem (GLAHN, 1982; BERG & MØLLER, 1994; EVERETT & McLEOD, 2005).

Os desafios do futuro incluem o controle da textura utilizando-se o menor conteúdo de sólidos possível (devido ao seu alto custo) e o mínimo de estabilizantes (devido ao crescente interesse dos consumidores por produtos saudáveis). O uso excessivo de estabilizantes pode impactar negativamente as propriedades sensoriais pelo aparecimento de sabor e aroma não naturais ou por uma textura indesejável de gel (LUCEY, 2004).

2.8. Estabilizantes

O termo hidrocolóides se refere a uma série de substâncias que possuem a capacidade de espessar ou gelificar sistemas aquosos. São polímeros de cadeia longa, como polissacarídeos ou proteínas, com tamanhos de colóides ($10\text{-}1000\text{\AA}$), que possuem as propriedades coloidais de se manterem suspensas sob a influência da gravidade e não serem visíveis ao microscópio (GLICKSMAN, 1982; PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

Os efeitos físicos desses materiais derivam de interações de suas moléculas entre si e com as moléculas do meio onde estão dispersos. Dessa forma, além de interagir apropriadamente com as proteínas, os lipídeos ou outras moléculas constituintes do meio, os hidrocolóides devem interagir primariamente com a água. É através dessas interações, que os hidrocolóides atingem suas propriedades funcionais, promovendo a estabilidade das moléculas em solução e em suspensão, ação emulsificante, espessante, gelificante, etc. (GLICKSMAN, 1982; PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

No estado sólido, as substâncias hidrocolóides possuem regiões amorfas, com numerosas ligações de pontes de hidrogênio ao acaso, que podem ser facilmente hidratadas. Em umidades normais, os hidrocolóides possuem 8-10% de sua água como água de hidratação. Quando adicionados a soluções aquosas, as moléculas de água penetram rapidamente nas regiões amorfas e se ligam aos sítios disponíveis, competindo e reduzindo as ligações inter-hidrocolóides (GLICKSMAN, 1982).

De acordo com a sua forma de ação, os hidrocolóides podem ser classificados como aniônicos ou neutros. Os hidrocolóides aniônicos ("adsorvedores") interagem com as cargas positivas na superfície das micelas de caseína (quando o pH encontra-se abaixo do seu pI), ou com o cálcio, fortalecendo a rede e reduzindo a sinérese (ex. CMC, pectina, carragena). Já hidrocolóides neutros ("não-adsorvedores") estabilizam a rede através de um aumento da viscosidade da fase contínua (ex. amido, goma guar) (EVERETT & McLEOD, 2005).

Segundo Glahn (1982), os hidrocolóides mais adequados para proteção contra os efeitos físicos do tratamento térmico são os polissacarídeos ácidos, ou seja, aqueles contendo grupos carboxílicos, como a pectina, CMC (carboximetil celulose) e PGA (propileno glicol alginato). Dentre as forças responsáveis pela ligação dos hidrocolóides às caseínas, as interações hidrofóbicas e eletrostáticas podem ser de grande importância. A habilidade estabilizante única desses hidrocolóides se deve à carga negativa que transferem às partículas de caseína, originando uma repulsão eletrostática entre as partículas que anula a força gravitacional e a tendência de adesão entre elas.

No final dos anos 50, pectinas de alta metoxilação começaram a ser adicionadas às bebidas lácteas ácidas, tendo sido consagradas como a melhor maneira de prevenir a formação de sedimento (LAURENT & BOULENGUER, 2003).

De acordo com os "Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados", a concentração máxima permitida para a maioria dos estabilizantes em iogurte é de 0,5% (m/m), isolados ou combinados no produto final, e 1% (m/m) para a gelatina e pectina. Os amidos ou amidos modificados são considerados como ingredientes opcionais e podem ser adicionados numa proporção máxima de 1% (BRASIL, 2000). Já o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea permite o uso dos estabilizantes aprovados sem limitações quantitativas, desde que estes cumpram as funções determinadas (BRASIL, 2005; MERCOSUL, 1996).

2.9. Pectina

Pectinas são misturas complexas de polissacarídeos, que representam cerca de 20 a 35% dos polímeros presentes na parede celular das plantas terrestres. Comercialmente, são extraídas de diversas frutas, em quantidade e qualidade variáveis. As principais fontes utilizadas atualmente são as cascas de cítricos (resíduo da extração de sucos e óleo), que contêm 25% de pectinas, e a polpa seca de maçã (resíduo da extração de suco), que contém 15 a 18% de pectinas (WALTER, 1991; PHILLIPS & WILLIAMS, 2000). Dentre os cítricos, as cascas de limas e limões são preferidas comercialmente devido à qualidade da pectina, apesar da casca de laranja ser disponível em quantidades muito maiores (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

Pectinas comerciais utilizadas como aditivos alimentícios são heteropolissacarídeos contendo, no mínimo, 65% em massa de unidades de ácido galacturônico, unidas por ligações glicosídicas α -(1,4). Por serem derivadas da quebra de protopectinas mais complexas, contêm uma variedade de açúcares em sua composição, sendo aproximadamente 2% de ramanose (aproximadamente um monômero a cada 50), e 10 a 20% de açúcares neutros (WALTER, 1991; PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

As unidades de açúcares estão presentes de forma não-aleatória, resultando na formação de blocos lineares (regiões lisas), consistindo de ácido homopoligalacturônico, e blocos altamente ramificados (regiões de 'cabeleiras'), contendo vários tipos de estruturas. A regularidade e a frequência das interrupções da cadeia com ramanoses são diferentes em pectinas de diferentes espécies vegetais. Por influenciarem a conformação do polímero em solução, a distribuição desses açúcares afeta as características de gelificação da pectina (WALTER, 1991; PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

Devido à extração comercial da pectina se dar geralmente em condições ácidas e sob aquecimento, muitas das regiões contendo alta proporção de açúcares neutros são hidrolisadas, restando principalmente os blocos galacturônicos estáveis ao ácido (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000). O conteúdo exato de ácido galacturônico no polímero depende da fonte vegetal e das condições de preparo. Pectinas comerciais de laranja e *grapefruit* geralmente contêm acima de 75%, e pectinas de limão, acima de 85% de ácido galacturônico. A distribuição dos grupos de ácidos galacturônicos esterificados pode ocorrer de forma não aleatória ao longo da cadeia, de forma que pectinas de diferentes fontes podem variar substancialmente quanto à composição e estrutura (WALTER, 1991).

As regiões da molécula de pectina que contêm unidades de ácido galacturônico em abundância consistem de uma mistura de metil éster, ácido livre e sais derivados do grupo carboxílico do ácido (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000). Um fator importante de caracterização da pectina é o grau de esterificação dos grupos carboxílicos da cadeia uronídica por álcool metila. Pode haver um grande espectro de esterificação dependendo da espécie, tipo de tecido e maturidade da planta, geralmente variando de 60 a 90%. A distribuição dos grupos carboxílicos livres aparenta ser regular ao longo da cadeia de pectina, sendo os grupos carboxílicos livres bastante isolados um do outro (WALTER, 1991).

As propriedades da pectina dependem do pH e da porcentagem dos grupos ácidos presentes na forma esterificada (grau de esterificação - DE) (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000). De acordo com o grau de esterificação, as pectinas são classificadas como de alta metoxilação (HM) e baixa metoxilação (LM). O valor de corte entre pectina HM e LM é arbitrário, situando-se entre 40 e 50% de esterificação. As pectinas isoladas pelos métodos convencionais são do tipo HM, sendo as pectinas LM produzidas através de tratamentos ácidos, alcalinos ou enzimáticos das pectinas HM (WALTER, 1991).

A pectina extraída de forma convencional normalmente possui de 67 a 73% de esterificação. A pectina de maçã pode ser extraída com esterificação acima de 80%. Os grupos esterificados podem ser hidrolisados sob condições alcalinas ou ácidas ou por pectina esterases, podendo chegar a 60% de esterificação. Uma maior desesterificação, até abaixo de 50%, resulta em pectinas de baixa metoxilação, que apresentam grande sensibilidade ao cálcio. Açúcares são normalmente adicionados às pectinas comerciais para padronizar o seu desempenho (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

As pectinas comerciais são muito heterogêneas (WALTER, 1991). Os produtores geralmente fornecem uma variedade de tipos de pectina, ideais para diferentes aplicações (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000). Em todas as aplicações, sua ação é muito dependente das condições exatas do produto, como pH, força iônica e composição, a proporção de açúcares e sua natureza e a adição ou não de frutas (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

A pectina é muito utilizada como agente gelificante, além de ser utilizada como texturizante, espessante e estabilizante. A multifuncionalidade das pectinas é derivada da natureza de suas moléculas, as quais apresentam regiões polares e apolares, o que possibilita sua incorporação em sistemas alimentícios bastante diversos, como refrigerantes *diets*, achocolatados, maionese e iogurte (WALTER, 1991).

Em produtos lácteos e análogos, a pectina pode ter duas funções diferentes: pectinas LM se comportam de maneira diferente e podem gelificar tanto o leite como

produtos mais ácidos pela interação com o cálcio; pectinas HM podem atuar como um estabilizante de dispersões de proteínas em baixos pHs tanto em iogurtes como em bebidas lácteas com suco de frutas (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

Pectinas de baixa metoxilação são utilizadas em iogurtes batidos ou em preparações de frutas adicionadas ao iogurte, para promover aumento de viscosidade (LUCEY, 2004), através da formação de complexos com as β -lactoglobulinas (SEDLMEYER et al., 2004). A capacidade do cálcio de formar complexos insolúveis com as pectinas está associada aos grupos carboxílicos livres na cadeia. Há um aumento na tendência de formação de gel quanto menor for o grau de esterificação das pectinas (WALTER, 1991).

Pectinas de alta metoxilação (DE > 70%) são largamente utilizadas como estabilizante em bebidas ácidas por prevenir a reagregação das proteínas durante o armazenamento e sedimentação da caseína (LUCEY *et al.*, 1999; LUCEY, 2004; SEDLMEYER *et al.*, 2004). As pectinas de alta metoxilação reagem menos com as proteínas do soro (SEDLMEYER et al., 2004), além de serem insensíveis ao cálcio, sendo preferíveis em bebidas lácticas ácidas. Ao contrário das pectinas LM, não há limite máximo (a não ser de ordem econômica) para o uso de pectinas HM em formulações lácteas de baixo pH, por ser insensível ao cálcio. A ausência de reação entre pectinas HM e o cálcio resulta em uma textura mais macia, cremosa. A concentração de pectina HM deve se restringir à quantidade que contribui à obtenção da textura ideal, sendo normalmente entre 0,2 e 1,0% (WALTER, 1991). O nível de uso é geralmente $\leq 0,2\%$ (LUCEY, 2004).

O mecanismo de estabilização de partículas de caseína pela pectina em sistemas acidificados se dá pela adsorção da pectina na superfície das partículas de caseína por interações eletrostáticas, garantindo estabilização estérica das partículas pelas moléculas de pectina (LUCEY et al., 1999). A estabilização ocorre em pH abaixo do ponto isoelétrico das caseínas (pH 4,6), quando estas estão carregadas positivamente (GLAHN, 1982), o que possibilita sua ligação a moléculas carregadas negativamente, como a extremidade carboxílica de moléculas de pectina (WALTER, 1991). Devido a existência de cargas em sua molécula, a pectina é sensível a variações de pH, em maior ou menor grau, dependendo da natureza e quantidade de cátions no sistema (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000). Para que se tenha uma boa estabilidade, é necessário garantir a presença de um gel fraco (SEDLMEYER *et al.*, 2004), o que ocorre em pHs próximos a 3,8 - 4,2 (LUCEY et al., 1999). A sorção elétrica da pectina nas partículas de caseína substitui a perda da camada de hidratação que estabiliza as micelas de caseína em pHs mais altos, como 6,8 (SEDLMEYER *et al.*, 2004), prevenindo sua precipitação por impedimento estérico

(SEDLMEYER *et al.*, 2004), num modelo parecido a uma bola de golfe coberta por uma cabeleira móvel.

As moléculas de pectina adsorvidas podem conferir carga negativa às partículas resultando em repulsão eletrostática (LUCEY *et al.*, 1999), sendo a estabilização da fase dispersa resultado também da repulsão entre as cargas negativas da cabeleira (WALTER, 1991). A carga positiva das caseínas em pH baixo diminui gradualmente, conforme as moléculas do estabilizante, carregadas negativamente, se ligam às partículas. A diminuição na carga positiva das partículas diminui a repulsão entre elas e aumenta a tendência de adesão, o que leva a um aumento da viscosidade quando em baixas concentrações de estabilizante. Com o aumento da concentração, as partículas passam a adquirir uma carga negativa, aumentando a repulsão entre as partículas e diminuindo a adesão entre elas, o que provoca uma queda na viscosidade. O abaixamento do pH até 3,5 faz com que a concentração de pectina necessária para a estabilização seja aumentada, devido à supressão parcial da dissociação do ácido galacturônico (aproximadamente 50% em pH 3,5) e aumento na carga positiva das partículas de caseína (GLAHN, 1982).

Uma pré-condição necessária para garantir a estabilidade do produto é uma interação ótima da pectina com as partículas de caseína. Para se evitar a agregação das partículas de caseína, todas as partículas devem estar recobertas pela pectina. Em bebidas lácteas acidificadas, as forças repulsivas entre as partículas de caseína devem ser fortes o suficiente para mantê-las em suspensão, mesmo partículas maiores. A concentração de pectina deveria ser ótima para a estabilização de sistemas com uma maior quantidade de partículas menores de caseína (SEDLMEYER *et al.*, 2004).

Em baixas concentrações de pectina, o fenômeno de agregação das partículas de caseína tende a ocorrer, resultando em um aumento máximo do tamanho das partículas quando 50% da superfície das caseínas está recoberta pela pectina. Esse fenômeno foi confirmado por Sedlmeyer *et al.* (2004) quando, diminuindo-se a concentração de pectina, um aumento da pressão de homogeneização levou a um aumento do tamanho das partículas, resultado da agregação das partículas não cobertas pela pectina.

Um excesso de hidrocolóides pode causar diminuição da agregação da caseína, através da formação de uma rede polimérica (EVERETT & McLEOD, 2005), o que pode resultar em uma consistência indesejável para o produto.

Bebidas lácteas acidificadas produzidas sem o uso de hidrocolóides ou com concentração insuficiente são mais viscosas. Com o aumento da concentração do estabilizante, a viscosidade da bebida diminui até que a completa estabilidade seja

atingida, permanecendo constante. A mínima concentração do estabilizante para a completa estabilidade depende do tamanho das partículas de caseína. Se as partículas de caseína forem muito pequenas, uma quantidade de estabilizante relativamente maior é requerida (GLAHN, 1982).

A coesividade dos grânulos de pectina dificulta a sua dispersão em água, podendo ocorrer formação de grumos quando umedecidos. A difusão da água através da superfície dos grânulos é lenta, e a mistura da pectina em água deve ocorrer sob agitação, para acelerar a dispersão dos grânulos. Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para facilitar a dispersão, como a interdispersão de um ingrediente solúvel (como o açúcar) à pectina, antes da adição de água. Dessa forma, a hidratação da pectina ocorre simultaneamente à dissolução do açúcar. A hidratação da pectina também pode ser facilitada pelo seu umedecimento com etanol antes da adição de água, substância normalmente utilizada como diluente de corantes e aromatizantes. O uso de um blender pode facilitar a dispersão sem um pré-tratamento da pectina. Os grânulos adicionados lentamente são arrastados pelo vortex criado pelo agitador, fazendo com que os grumos se desintegrem. A pectina é um dos biopolímeros mais estáveis à deformação, não se despolimerizando sob altas tensões de deformação e, conseqüentemente, não perdendo viscosidade (WALTER, 1991).

Na maioria das aplicações da pectina, é essencial garantir sua completa dissolução. A pectina não dissolve em condições próximas à sua gelificação, e a pectina HM, em particular, não se dissolve em soluções de açúcares acima de 20-25%. Assim como para a maioria das gomas, é essencial que as partículas sólidas sejam dispersas antes que comecem a se dissolver e grudar, o que pode ser conseguido tanto com um sistema de alta agitação ou pela mistura da pectina com parte do açúcar (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

A pectina pura é essencialmente de uma fibra solúvel dietética, mas o produto comercial pode conter pequenas quantidades de proteínas, sódio e cálcio, e açúcar ou dextrose para padronização. Ela pode ser declarada como carboidrato, dependendo da legislação local, o que afeta a declaração do valor energético. A pectina é geralmente considerada um dos aditivos mais seguros e aceitos para uso em alimentos (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

2.10. Homogeneização e Tamanho de Partículas

Os polissacarídeos ácidos permitem a produção de uma bebida de baixa viscosidade, tratada termicamente, sem a formação de sedimento ou separação de soro durante a estocagem. Entretanto, se as partículas forem muito grandes, as forças repulsivas serão relativamente pequenas para manter partículas pesadas em suspensão, resultando na formação de precipitado. Dessa forma, o tamanho das partículas de caseína é um fator importante na obtenção de produtos longa vida (GLAHN, 1982). Dessa forma, para que se obtenha um aumento considerável na estabilização do produto pela pectina, a homogeneização se torna necessária (SEDLMEYER *et al.*, 2004).

Em um sistema com reduzido teor protéico, a porcentagem de sedimentação e a formação de agregados tende a diminuir com o aumento da pressão de homogeneização. Isso indica que o início da reação entre as partículas de caseína e as moléculas de pectina ocorre durante a homogeneização. Camadas múltiplas de pectina podem ser formadas sobre as caseínas, prevenindo a reagregação das partículas (SEDLMEYER *et al.*, 2004).

A homogeneização do leite fermentado visa quebrar os agregados de proteína em presença de pectina. A quantidade de pectina requerida será uma função da pressão de homogeneização a ser utilizada e isso também afeta a viscosidade do produto. Pectina adicional, acima da quantidade requerida para estabilização da dispersão, aumenta a viscosidade do produto final, o que pode ou não ser desejável. Tipicamente, aproximadamente 0,4% da pectina selecionada é adicionada em solução ou dispersa em açúcar e o produto é tratado termicamente e homogeneizado, resultando em uma bebida sem grumos e livre de sedimentação, com máxima estabilidade (PHILLIPS & WILLIAMS, 2000).

Para a estabilização de produtos lácteos acidificados, uma concentração mínima de pectina é necessária (SEDLMEYER *et al.*, 2004). O fato dessa concentração mínima depender do tamanho das partículas indica que a superfície total, ou pelo menos uma parte crítica das partículas deve estar coberta pelo estabilizante (GLAHN, 1982).

Supondo que as partículas de caseína apresentem um formato esférico, a área superficial do total das partículas é dobrada quando o diâmetro é diminuído pela metade. A concentração mínima de estabilizante requerida para estabilização das partículas aumenta de forma proporcional (GLAHN, 1982).

Se a pectina for adicionada em abundância, uma maior estabilidade pode ser obtida através do aumento da pressão de homogeneização. Entretanto, em sistemas cujo

conteúdo de pectina estiver próximo ao mínimo necessário, um aumento na quantidade de pequenas partículas, resultado de uma homogeneização mais intensa, pode diminuir a estabilidade do produto (SEDLMEYER et al., 2004).

Laurent & Boulenguer (2003) mostraram que a distribuição do tamanho das partículas é influenciado pela homogeneização, sendo provavelmente determinado pela pressão aplicada. Sedlmeyer *et al.* (2004) estudaram a influência da pressão de homogeneização e conseqüente distribuição do tamanho das partículas na estabilidade de bebidas lácteas acidificadas contendo pectina. Um aumento na pressão de homogeneização resultou em diminuição da sedimentação. Condições de homogeneização mais intensas resultariam em um aumento do número de pequenas partículas e, conseqüentemente, uma maior concentração de pectina seria requerida para recobrir todas essas partículas, de forma a manter a estabilidade.

2.11. Microscopia

A microscopia óptica tem sido utilizada como um método qualitativo rápido para se analisar a estabilidade das bebidas. Bebidas estáveis apresentam partículas de caseína de tamanho até 2µm, enquanto grandes agregados podem ser observados em bebidas instáveis (LUCEY et al., 1999). Observando-se a amostra ainda líquida, as partículas se movem livremente quando a preparação está completamente estabilizada, enquanto que, em preparações sub-estabilizadas, as partículas tendem a se juntar, formando agregados (GLAHN, 1982).

Rearranjos durante e logo após a formação do gel podem acarretar em sinérese e separação do soro. Em bebidas lácteas acidificadas com conteúdo insuficiente de pectina, a separação do soro pode ocorrer devido à formação de grandes agregados de caseína, ou pela existência de uma estrutura fraca de gel, instável, que poderia sofrer rearranjos durante a estocagem, reduzindo a sua capacidade de retenção de água e expulsando o soro. A microscopia exibida por Lucey *et al.* (1999), de bebidas com diferentes concentrações de pectina, evidencia essa possibilidade. A presença de suficientes moléculas de pectina pode prevenir a formação de grandes agregados ou de um gel instável, minimizando a separação de soro (LUCEY et al., 1999).

Glahn (1982) observou forte adesão das partículas em baixas concentrações de pectina, diminuindo gradativamente com o aumento da concentração, de forma

proporcional à diminuição da viscosidade, até se obter livre escoamento das partículas, sem adesão, em concentrações de estabilizantes correspondentes ao mínimo necessário à estabilização do produto.

2.12. Avaliação de Sabor

A percepção do sabor é altamente complexa e depende de duas percepções químicas distintas: gosto e odor. A sensação do gosto está ligada a compostos solúveis e do odor, a compostos voláteis. O sabor percebido é uma combinação dos dois, além da interferência de outros estímulos, como a estrutura física e a textura (WALSTRA *et al.*, 2006).

A concentração mínima na qual um composto de sabor pode ser percebido é chamada de *threshold*, e varia largamente entre diferentes compostos, estando entre 10^3 e 10^{-4} mg/kg para a maioria deles. Isso significa que muitos compostos podem ser perceptíveis mesmo em quantidades diminutas. Esse valor, porém, depende também da composição do material onde está presente, pois a maioria dos compostos aromáticos voláteis é hidrofóbica e se associa às proteínas, diminuindo a percepção do aroma. Além disso, substâncias com sabor mais forte mascaram substâncias de sabor fraco, e substâncias que, em baixas concentrações dão aromas agradáveis, podem dar aromas desagradáveis quando em alta concentração (WALSTRA *et al.*, 2006).

Entretanto, a percepção do sabor é algo puramente subjetivo e depende do provador. A sensibilidade para um composto varia significativamente entre indivíduos diferentes. A percepção do sabor também depende significativamente de experiências anteriores do provador, além das condições de análise (WALSTRA *et al.*, 2006).

Julgadores novatos apresentam tendência a tentar descobrir os segredos da amostra, procurando aromas que muitas vezes não existem. Senso crítico exagerado não aumenta a qualidade de julgamento de uma pessoa, levando geralmente ao hábito de suspeitar da presença de aromas indesejáveis em toda amostra provada (BODYFELT *et al.*, 1988).

Resultados de avaliação de sabor de um alimento devem ser analisados cuidadosamente. Muitas informações importantes podem ser obtidas, especialmente em relação a *off-flavors*. Na maioria dos casos, diversos compostos contribuem para a sensação do sabor, sendo desejável um equilíbrio entre os eles (WALSTRA *et al.*, 2006).

A ocorrência de defeitos de sabor durante e após o processamento pode representar um problema na produção de leite e derivados. Esses defeitos são geralmente causados por compostos com valores de *threshold* muito baixos, possibilitando que até uma ligeira contaminação seja percebida (MAARSE, 1991). Assim como ocorre com os outros sentidos humanos, é geralmente difícil descrever em palavras a percepção do sabor (BODYFELT *et al.*, 1988). Dessa forma, existem diversas causas possíveis para o aparecimento de um sabor indesejável.

Dentre outras características que compõem o sabor, além de gosto e odor, a textura é provavelmente a mais importante, sendo que maciez ou aspereza, tamanho de partículas, solubilidade, etc, podem modificar a percepção do sabor (BODYFELT *et al.*, 1988). De acordo com Szczesniak (1974), a textura influencia a aceitabilidade de alimentos. A avaliação da aparência também é muito importante, envolvendo a visualização da superfície do produto, cor, pureza visível, presença de material estranho, pontos ou bolores, e separação de soro.

Um defeito que influencia a sensação na boca ainda mais que o sabor é a chamada 'adstringência'. Esse defeito é particularmente observado em leite UHT e leite esterilizado e é provavelmente causado por alterações físicas no leite (MAARSE, 1991).

Conforme Tamime & Robinson (1991), o sabor e aroma de iogurte são provenientes principalmente do ácido láctico e de pequenas quantidades de compostos aromáticos. O principal problema de qualidade do iogurte é acidez elevada, sendo ainda mais pronunciada em iogurtes desnatados. Além disso, o iogurte pode se tornar amargo devido à proteólise excessiva. O desenvolvimento desses defeitos de aroma geralmente determina a vida-de-prateleira do produto. A acidificação e alterações enzimáticas continuam a ocorrer, mesmo que lentamente no iogurte sob refrigeração (WALSTRA *et al.*, 2006).

As proteínas e a lactose podem ser importantes fontes para a formação de compostos de sabor no leite, através de processos químicos, enzimáticos e microbianos. Compostos sulfurados podem ser formados pelo aquecimento e também quando o leite é exposto à luz (MAARSE, 1991). Ação enzimática ou bacteriana nas proteínas do leite pode resultar em hidrólise das ligações peptídicas, resultando na formação de um sabor amargo (BODYFELT *et al.*, 1988). Compostos heterocíclicos são produzidos pelas reações de escurecimento não-enzimático, como caramelização e reação de Maillard (MAARSE, 1991).

2.13. Embalagem

A embalagem do iogurte deve mantê-lo protegido de gases, como o oxigênio, que além de facilitar o crescimento de fungos e leveduras pode causar a oxidação da gordura e aromas, e da luz, que pode levar à descoloração do produto ou catalisar reações de oxidação. A embalagem também deve evitar a perda de aromas voláteis ou a absorção de odores indesejáveis, além de ser resistente ao ácido. Iogurte pode ser encontrado em embalagens como vidro, polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloreto de vinila (PVC), policloreto de vinilideno (PVdC), sacos plásticos e cartonados (TAMIME & ROBINSON, 2000).

A transmitância da luz e permeabilidade de gases pelo material da embalagem podem influenciar na qualidade do iogurte. Segundo Maarse (1991), amostras embaladas em vidro transparente e marrom, copos de poliestireno sem coloração, marrom e recoberto por papel-cartão, estocadas sob luz e no escuro, apresentaram diferenças sensoriais em poucos dias (MAARSE, 1991). Segundo Castro & Pouzada (2003), a permeabilidade ao oxigênio do PEAD é menor que do PP e do PS (581, 781 e 1070 cm³/m²d.bar, respectivamente, a 23°C e 0%UR)

O desenvolvimento de novos métodos para a esterilização ou sanificação do material de embalagem, principalmente aqueles que poderiam ser realizados à baixa temperatura, bem como o aprimoramento das máquinas de envase, colaboraram definitivamente para a introdução de novos materiais de embalagem no mercado (ANON, 1971). O avanço da tecnologia permitiu que materiais de embalagens de baixa resistência térmica fossem utilizados em processos que tradicionalmente utilizavam o enchimento a quente, podendo fazê-lo a frio (RICE, 1993).

A radiação ionizante tem sido utilizada na esterilização de materiais de embalagem, como uma alternativa a tratamento térmico ou químico. A esterilização é realizada em uma planta comercial, a partir de fontes de Cobalto-60 (STOFFERS et al., 2004). A dosagem de radiação geralmente utilizada na esterilização comercial de alimentos embalados varia de 20 a 45kGy, enquanto que doses de 2 a 10kGy são suficientes para se obter um efeito semelhante à pasteurização (GOULAS *et al.*, 2004).

O polietileno (PE) é um polímero de excelentes propriedades físicas e químicas, com alta resistência à degradação pela radiação (REYES *et al.*, 2001). Segundo Goulas *et al.* (2004), dosagens de 5 a 10kGy não resultam em alterações das propriedades mecânicas e de migração de diversos polímeros, incluindo PEAD. Em doses de 60kGy,

ocorre degradação física moderada a severa da maioria dos polímeros, mas não há aumento na migração em relação ao material não irradiado. No caso do PEAD, descoloração, desenvolvimento de odor e transferência de sabor para os alimentos podem ocorrer em dosagens acima de 30kGy. Porém, segundo Stoffers *et al.* (2004), o PEAD não apresentou alterações sensoriais ou migração, mesmo em dosagens acima de 54kGy.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Ativação da cultura

Leite em pó desnatado marca Molico® (Nestlé, Araçatuba, Brasil) foi reconstituído a 11% de sólidos totais, tratado termicamente a 90 °C/15 min e resfriado a 45°C. Inoculou-se 0,02% de cultura mista liofilizada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, com produção de exopolissacarídeos, denominação comercial Yo-Mix 601 Lyo (Danisco Brasil, Cotia, Brasil). O leite foi incubado a 45°C até atingir um pH de 4,80. O leite fermentado foi então resfriado num banho de gelo e estocado a 5 °C para utilização no dia seguinte.

3.2. Preparação do Iogurte Líquido

O iogurte foi produzido conforme fluxograma apresentado na Figura 3.2.1. O leite cru integral foi desnatado a 40-45°C, pré-aquecido a 60 - 65°C e adicionado de 12% de açúcar, sob agitação constante. A mistura foi pasteurizada a 80°C por 30 min em um tanque pasteurizador Mixmatic Elétrico (Inadal, São Paulo, Brasil), e em seguida resfriada à temperatura de incubação (42 - 44°C). Foram inoculados no leite 2% da cultura mista ativada. Ao atingir pH 4,6, a refrigeração da camisa do tanque foi acionada, sem agitação. O coágulo foi mantido refrigerado (10 - 12°C) por 1 (uma) noite no próprio tanque, atingindo pH 4,0. O gel foi então quebrado e transportado em latões para a planta piloto da empresa Danisco Brasil, Cotia, Brasil. Misturou-se 0,45% da pectina de alta metoxilação Grindsted® Pectin AMD 382 (Danisco Brasil, Cotia, Brasil) a 2% de açúcar e adicionou-se a mistura ao gel lentamente em um tanque com agitação, além de 0,12% de aromatizante sabor morango (Danisco Brasil, Cotia, Brasil) e 0,05% de corante Carmim (Gemacom, Juiz de Fora, Brasil), sob agitação. O iogurte foi então submetido a duas

condições de tratamento térmico: 72°C / 15 seg e 110°C / 15 seg, em um trocador de calor tubular, seguido de homogeneização asséptica a 15MPa e 5MPa, e resfriamento a 10 - 12°C. O iogurte foi envasado em uma capela de fluxo laminar, em garrafas plásticas de polietileno de alta densidade (PEAD) de 500ml, esterilizadas por radiação gama a 5kGy, fechadas por tampas de rosca e selo de indução. A estocagem foi realizada a temperatura ambiente (25 - 30°C) e a temperatura de refrigeração (4 - 6°C), para cada um dos tratamentos térmicos, perfazendo ao todo 4 tratamentos.

Foram realizadas avaliações periódicas de alterações físico-químicas (pH e acidez titulável), microbiológicas (contagem total, contagem de bactérias lácticas e contagem de bolores e leveduras), sensoriais (aceitação, incluindo avaliação de aparência, sabor, viscosidade, impressão global e intenção de compra) e acompanhamento das características estruturais do iogurte (sedimentação, sinérese, viscosidade aparente e tamanho de partículas), visando a determinação da vida útil do produto sob as condições experimentadas.

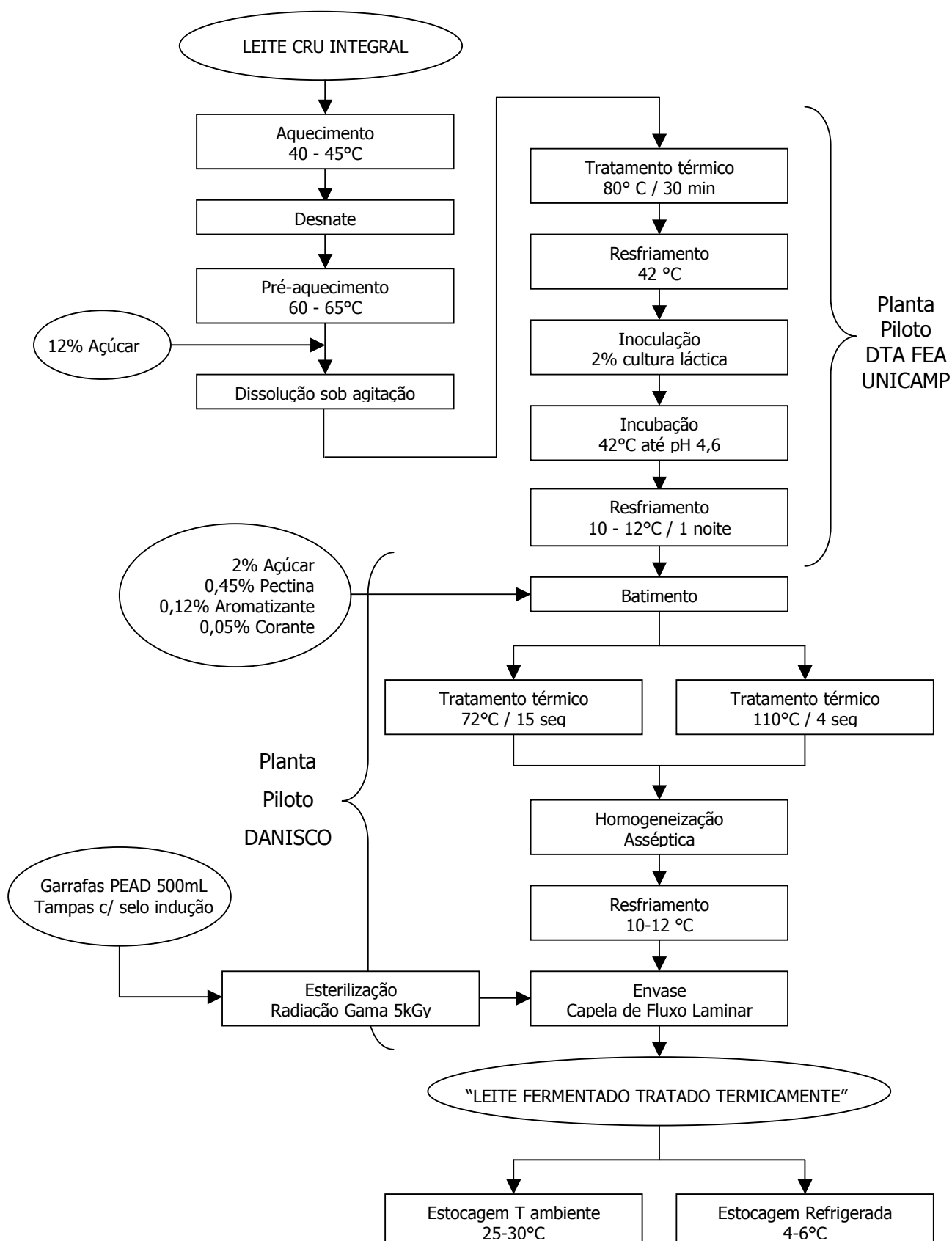


Figura 3.2.1. Fluxograma de processo para “leite fermentado tratado termicamente” com dois tratamentos térmicos pós fermentação e submetido a duas condições de estocagem.

3.3. Análises do Leite Desnatado

Foram realizadas, em triplicata, as seguintes análises físico-químicas:

- Acidez Titulável e pH em pHmetro, segundo ATHERTON & NEWLANDER (1981);
- Extrato Seco Total, pelo método nº 925.23 da AOAC (1997);
- Cinzas, em mufla a 550 °C, pelo método nº 969.21 da AOAC (1997);
- Gordura, pelo método Gerber, segundo o Instituto Adolfo Lutz (1985);
- Proteína Total, através da determinação de Nitrogênio Total (NT) pelo método de micro-Kjeldahl, onde Proteína Total = NT x fator de 6,38 (AOAC, 1997);
- Carboidratos, calculado por diferença.

3.4. Análises do Iogurte Líquido

3.4.1. Amostras

Em cada bloco foram obtidas quatro amostras diferentes, de acordo com o tratamento térmico (72°C/15s ou 110°C/15s) e com a temperatura de estocagem (25-30°C ou 5-7°C), tendo sido identificadas como:

- Amostra 72-R: iogurte tratado a 72°C/15s e mantido sob refrigeração;
- Amostra 72-A: iogurte tratado a 72°C/15s e mantido a temperatura ambiente;
- Amostra 110-R: iogurte tratado a 110°C/4s e mantido sob refrigeração;
- Amostra 110-A: iogurte tratado a 110°C/4s e mantido a temperatura ambiente.

Todas as amostras foram avaliadas a cada 3 semanas, para a determinação da vida útil.

3.4.2. Análises Microbiológicas

- Contagem Total ou Contagem Padrão em Placas, em meio PCA ("Plate Count Agar", Oxoid, Basingstoke, England), em quintuplicata, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , sendo as placas incubadas à temperatura de 35°C por 48 horas;
- Contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, em meio MRS ("De Man, Rogosa, Sharpe", Oxoid, Basingstoke, England) com sobrecamada, em quintuplicata, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , e as placas incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas;

- Contagem de Bolores & Leveduras, em meio PDA ("Potato Dextrose Agar", Oxoid, Basingstoke, England) enriquecido com tetraciclina e gentamicina, em quintuplicata, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , e as placas incubadas à temperatura de 23 - 25°C por 3 a 5 dias; todas segundo Marshall (1993). Uma amostra obtida antes do tratamento térmico foi submetida às mesmas análises.

3.4.3. Análises Físico-Químicas

- Acidez Titulável e pH em pHmetro, segundo ATHERTON & NEWLANDER (1981);
- Sedimentação, através de centrifugação a 3000g/20min e cálculo da % de sedimento (DANISCO A/S, [s.d.]).
- Separação de soro (sinérese), através de centrifugação a 500g/10min e cálculo da % de soro separada, segundo LUCEY *et al.* (1998a), modificado*;
- Tamanho de partículas, através de equipamento Malvern Mastersizer X, com diluição da amostra em tampão citrato-fosfato pH 4,0.
- Microscopia óptica, em microscópio Leica DMLM e software Leica Q500IW, através da observação da amostra em lâmina.
- Viscosidade aparente, através de um viscosímetro Brookfield, a 10°C e 30rpm por 30 segundos, utilizando spindle nº18 (DANISCO A/S, [s.d.]).
- Cor, através de um espectrofotômetro de cor Hunter Lab, modelo Color Quest II, sistema de CIE $L^*a^*b^*$, ângulo de visão 10°, iluminante D₆₅, calibração com reflectância incluída, cubeta de 20mm.

3.4.4. Análise Sensorial

Foram realizados Testes de Aceitação e Intenção de Compra. As amostras foram avaliadas periodicamente por 30 consumidores potenciais com relação à aparência, sabor e impressão global, utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos. Para avaliação da viscosidade utilizou-se uma escala do ideal de 7 pontos e a intenção de compra foi avaliada através de escala hedônica de 5 pontos. Os testes foram realizados em cabines individuais, sob luz branca. A ficha de análise sensorial e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) apresentados aos provadores estão nos Anexos I e II. O anexo III apresenta a cópia da

* A metodologia sugerida por LUCEY *et al.* (1998a) é aplicável a iogurte firme, tendo sido a velocidade de centrifugação adaptada a iogurte líquido.

aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

3.5. Determinação da Vida-de-Prateleira

As análises do produto final foram realizadas na primeira semana e a cada 3 semanas após a fabricação, o que equivale a 20% da vida-de-prateleira de um produto com 3 a 4 meses de validade (MAN & JONES, 1996). O fim da vida-de-prateleira para uma determinada amostra foi caracterizado por uma avaliação sensorial média 5 para um dos atributos avaliados (aparência, sabor e impressão global) ou intenção de compra com maioria negativa. Neste caso foram interrompidas também a seqüência de realização das outras análises.

3.6. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

Os resultados de composição do leite e dos iogurtes foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Para a avaliação de pH, acidez titulável, sedimentação, viscosidade aparente, tamanho de partículas, cor, microbiologia e análise sensorial do iogurte, foi adotado um delineamento do tipo split-split-plot. O fator estudado foi o tratamento térmico do leite (A), sendo a temperatura de estocagem (B) tratada como uma sub-parcela do mesmo, e o fator tempo de armazenamento (C) uma sub-parcela da temperatura (B), como ilustrado na Figura 3.6.1. Os ensaios foram realizados em 2 blocos.

As diferenças entre os tratamentos das amostras e os tempos de armazenamento, e as interações entre elas, obtidas nas avaliações de Ph, acidez titulável, sedimentação, viscosidade aparente, tamanho de partículas, cor, microbiologia e sensorial foram avaliadas por ANOVA. Os fatores e/ou interações que apresentaram valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

As análises dos resultados (graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades) estão apresentadas na forma de Tabelas, sendo os valores significativamente diferentes destacados por um (*).

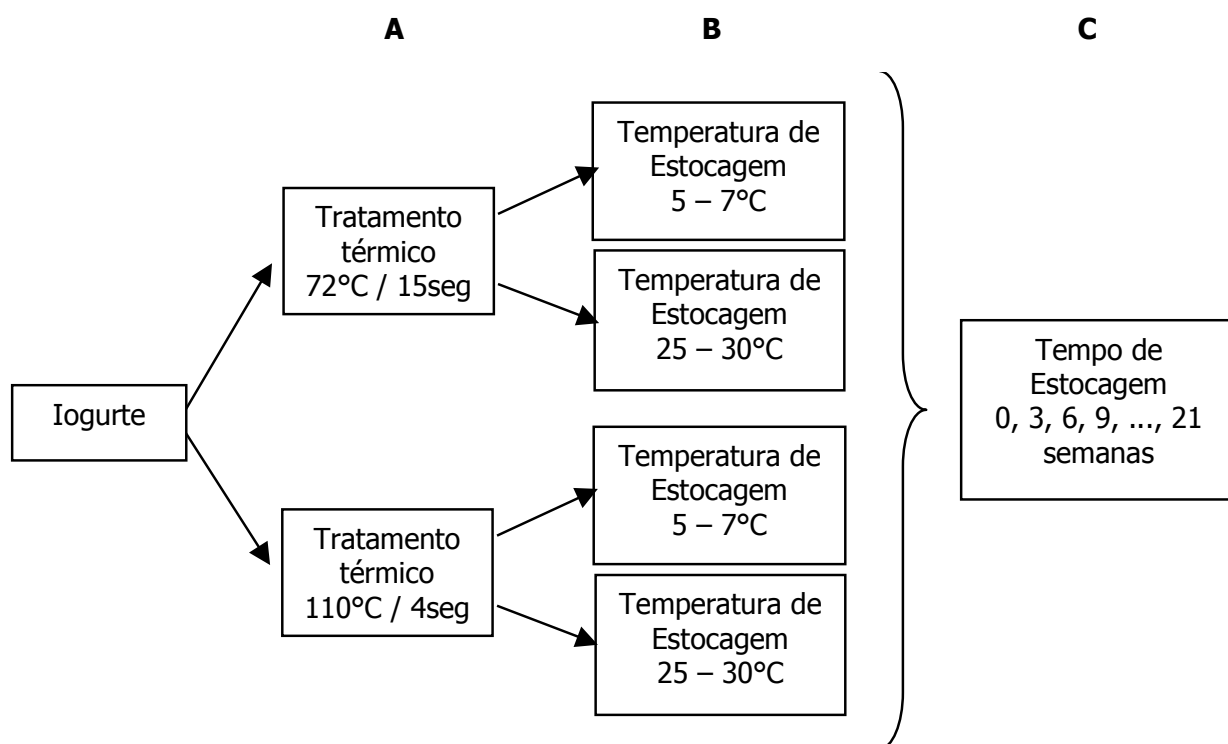


Figura 3.6.1. Planejamento estatístico: esquema do split-split-plot.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do Tratamento Térmico na Composição das Bebidas Lácteas

O leite utilizado na fabricação da bebida láctea apresentou a seguinte composição: 8,6% de extrato seco total, 3,36% de proteínas, 0,05% de gordura, 0,7% de cinzas e 4,54% de carboidratos (por diferença). A Tabela 4.1.1 apresenta o efeito do tratamento térmico na composição das bebidas lácteas tratadas a 72°C/15s e 110°C/4s.

Tabela 4.1.1. Efeito do tratamento térmico na composição da bebida láctea.

COMPOSIÇÃO	IOGURTE 72°C/15s	IOGURTE 110°C/4s
Extrato Seco Total	19,41 ± 0,57 ^a	19,31 ± 0,37 ^a
Proteína	3,26 ± 0,23 ^a	3,17 ± 0,21 ^a
Gordura	0,05	0,05
Cinzas	0,66 ± 0,03 ^a	0,62 ± 0,06 ^a
Carboidratos	15,49	15,52

* Médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

As bebidas lácteas tratadas com diferentes intensidades não apresentaram diferenças significativas quanto à composição.

4.2. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Microbiologia das Bebidas Lácteas

Os resultados obtidos na contagem total, bactérias lácticas e bolores e leveduras realizadas nas diferentes amostras ao longo de 21 semanas estão apresentados na Tabela 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Análise microbiológica das bebidas lácteas ao longo do tempo: contagem total, bactérias lácticas e bolores e leveduras, em UFC/ml.

		Semanas							
	Antes TT	0	3	6	9	12	15	18	21
72-R									
Contagem Total	3,5 x 10 ⁸	133	187	127	128	197	136	155	120
Bactérias Lácticas	3,1 x 10 ⁹	126	174	126	124	216	130	147	120
Bolores e Leveduras	30	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
72-A									
Contagem Total	3,5 x 10 ⁸	133	132	121	103	106	105		
Bactérias Lácticas	3,1 x 10 ⁹	126	134	135	114	104	98		
Bolores e Leveduras	30	< 10	5	< 10	< 10	< 10	< 10		
110-R									
Contagem Total	3,5 x 10 ⁸	< 1	1	< 1	1	1	1	< 1	1
Bactérias Lácticas	3,1 x 10 ⁹	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1	< 1	< 1
Bolores e Leveduras	30	< 10	5	< 10	< 10	10	< 10	< 10	< 10
110-A									
Contagem Total	3,5 x 10 ⁸	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1			
Bactérias Lácticas	3,1 x 10 ⁹	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1			
Bolores e Leveduras	30	< 10	< 10	5	< 10	< 10			

As contagens microbiológicas do leite fermentado antes de sofrer os tratamentos térmicos eram de $3,5 \times 10^8$ UFC/ml de bactérias totais, $3,1 \times 10^9$ UFC/ml de bactérias lácticas e 30 UFC/ml de bolores e leveduras. A intensidade do tratamento térmico influenciou a contagem total e de bactérias lácticas, que sofreram reduções de 6 a 7 ciclos logarítmicos no tratamento mais brando ($72^\circ\text{C}/15\text{s}$) e 8 ou 9 ciclos no tratamento mais intenso ($110^\circ\text{C}/4\text{s}$). As condições de estocagem e o tempo não influenciaram as contagens microbiológicas das diferentes bebidas lácteas, que se mantiveram constantes durante todo o período analisado (aproximadamente 1 a 2×10^2 UFC/ml de bactérias lácticas e totais para o tratamento mais brando, < 1 UFC/ml de bactérias lácticas e totais no tratamento mais intenso e < 10 UFC/ml de bolores e leveduras para ambos os tratamentos (Tabela 4.2.1).

O não desenvolvimento de bolores e leveduras durante todo o período de estocagem comprovou que a esterilização das embalagens (irradiação gama) foi eficiente, e o envase foi realizado em condições satisfatórias, evitando que a contaminação do produto interferisse na sua estabilidade microbiológica e, conseqüentemente, na determinação da sua vida-de-prateleira.

Como as contagens de todos os produtos se mantiveram baixas durante todo o período de estocagem, a microbiologia não foi um fator de influência na determinação da vida-de-prateleira dos produtos. Mesmo o tratamento mais brando foi suficiente para a total eliminação de microrganismos contaminantes, como bolores e leveduras, além da redução e inativação das bactérias lácticas, evitando seu crescimento e desenvolvimento de pós-acidificação. Dessa forma, pode-se concluir que o uso de um tratamento térmico ainda mais brando que a pasteurização, como por exemplo, termização, poderia ser suficiente para garantir a estabilidade microbiológica do "leite fermentado tratado termicamente", resultando em menores alterações sensoriais.

4.3. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento no pH e Acidez Titulável das Bebidas Lácteas

A Tabela 4.3.1 apresenta a avaliação estatística dos dados de evolução de pH e acidez titulável dos iogurtes tratados termicamente, com a temperatura e o tempo de armazenamento.

Tabela 4.3.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para pH e acidez titulável.

Fatores	GL	pH		ACIDEZ TITULÁVEL	
		QM	P	QM	P
Tratamento Térmico	1	0,0008	0,6721	34,2652	0,1096
Erro(a)	1	0,0025		1,0362	
Temperatura de Estocagem	1	0,0004	0,6578	0,9280	0,0715
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	< 0,0001	0,9504	0,5520	0,1123
Erro(b)	2	0,0014		0,0743	
Tempo	7	0,0492	< 0,0001*	43,2508	< 0,0001*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,0004	0,9987	1,4865	0,6795
Temperatura de Estocagem*Tempo	5	0,0003	0,9971	0,2809	0,9841
Erro(c)	27	0,0046		2,1537	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

Tanto o pH quanto a acidez foram influenciados apenas pelo tempo ($p < 0,001$). Os resultados de pH e acidez titulável estão expostos na Figura 4.3.1.

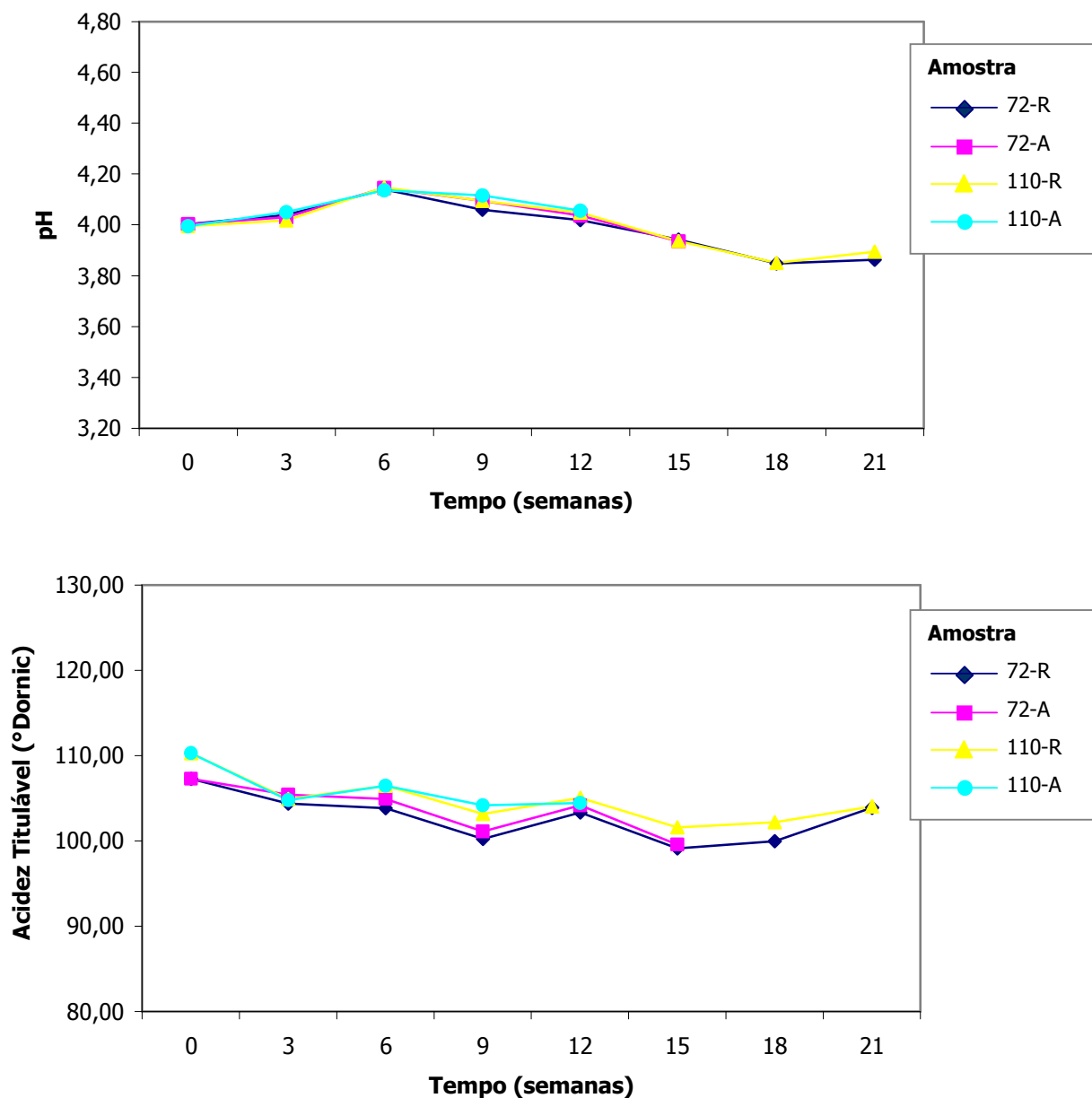


Figura 4.3.1. Evolução do pH e acidez titulável dos iogurtes ao longo do tempo.

O pH das bebidas lácteas se manteve entre 3,85 e 4,15 e a acidez titulável entre 101 e 110° Dornic. Apesar da variação ao longo do tempo ser estatisticamente significativa, pode-se considerá-la desprezível do ponto de vista prático, pois se manteve dentro de uma faixa muito estreita, sem aumento ou queda brusca. O uso de diferentes equipamentos durante o período de análise provavelmente causou essa diferença tanto no pH quanto na acidez, já que ambas as análises foram realizadas em pHmetro. Dessa

forma, a relativa constância nos valores de pH e acidez é um indicativo da estabilidade microbiológica do produto.

O pH do leite fermentado tratado termicamente é um fator importante na estabilização, pois a pectina é adsorvida na micela de caseína em pH abaixo do ponto isoelétrico (4,6), quando esta apresenta ligeira carga positiva (SEDLMEYER *et al.*, 2004), mas devendo se manter acima de 3,5, pois a supressão da dissociação dos grupos carboxílicos do hidrocolóide pode afetar a estabilidade de forma adversa (GLAHN, 1982). Dessa forma, para a produção de bebidas lácteas acidificadas estabilizadas por pectina, é recomendado o uso de géis ácidos com pHs próximos a 3,8 – 4,2 (LUCEY *et al.*, 1999).

Entretanto, segundo Walstra *et al.* (2006), o principal problema de qualidade do iogurte é a acidez excessiva, sendo o aroma ácido ainda mais pronunciado em iogurtes desnatados. Conforme Lück & Mostert (1971), um iogurte com pH na faixa de 3,9 a 4,1 é desagradável ao paladar devido à sua alta acidez. Para Kosikowski (1977), o pH de iogurte deve estar na faixa de 4,2 a 4,4.

Uma sugestão seria a realização de estudos de pH x estabilidade x aceitação sensorial, ou seja, seria interessante avaliar o quanto um aumento no pH poderia melhorar a aceitação sensorial e qual seria o efeito na pectina e na conseqüente estabilidade física do produto.

4.4. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Estabilidade Física das Bebidas Lácteas: Sedimentação, Sinérese, Tamanho de Partículas e Viscosidade

O tratamento térmico ($p=0,6722$) e a temperatura de estocagem ($p=0,8229$) não influenciaram a sedimentação do produto, como mostra a Tabela 4.4.1. A sedimentação foi influenciada apenas pelo tempo de armazenamento ($p=0,0056$).

Tabela 4.4.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para sedimentação.

Fatores	GL	SEDIMENTAÇÃO	
		QM	P
Tratamento Térmico	1	0,0321	0,6722
Erro(a)	1	0,1004	
Temperatura de Estocagem	1	0,0048	0,8229
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,0366	0,5565
Erro(b)	2	0,0747	
Tempo	7	0,2881	0,0056*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,0576	0,6281
Temperatura de Estocagem*Tempo	5	0,0062	0,9946
Erro(c)	27	0,0763	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

A Figura 4.4.1 mostra a evolução da sedimentação das amostras ao longo do período estudado.

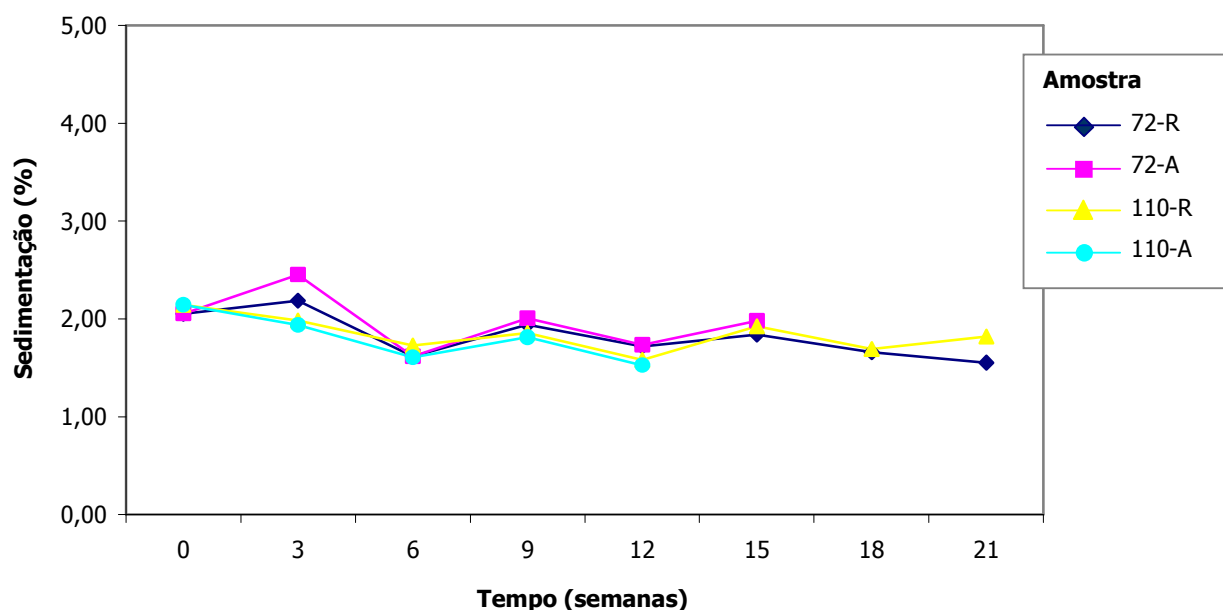


Figura 4.4.1. Sedimentação (%) das amostras ao longo do tempo.

Segundo Danisco A/S [s.d.], produtos longa vida com sedimentação abaixo de 5% apresentam boa estabilidade durante a vida útil. Todos os resultados obtidos nas análises de sedimentação das bebidas lácteas estiveram abaixo de 2,5%.

A sedimentação foi influenciada pelo tempo devido a uma ligeira diminuição após as 3 primeiras semanas de estocagem, o que pode ser devido a rearranjos na estrutura do gel. No restante do tempo, a sedimentação foi praticamente constante, variando dentro de uma pequena faixa (1,6 – 1,9%).

Os produtos não apresentaram sinérese, nem mesmo sob centrifugação, durante todo o período de estocagem em ambas as temperaturas.

A existência de partículas grandes leva à instabilidade. Dessa forma, a porcentagem de sedimentação pode ser relacionada ao tamanho das partículas (SEDLMEYER et al., 2004). A Tabela 4.4.2 contém os dados estatísticos obtidos para o tamanho de partículas das diferentes amostras, no início da vida útil e após 21 semanas de estocagem.

Tabela 4.4.2. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para tamanho de partículas.

Fatores	GL	TAMANHO DE PARTÍCULAS	
		QM	P
Tratamento Térmico	1	0,2078	0,4403
Erro(a)	1	0,1425	
Temperatura de Estocagem	1	0,0895	0,2383
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,0238	0,4146
Erro(b)	1	0,0138	
Tempo	1	2,7418	0,0115*
Tratamento Térmico*Tempo	1	1,0083	0,0648
Temperatura de Estocagem*Tempo	1	1,1503	0,0531
Erro(c)	5	0,1810	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

O tamanho das partículas das amostras foi influenciado apenas pelo tempo (Tabela 4.4.2). A Figura 4.4.2 apresenta o tamanho médio das partículas das diferentes amostras, no início e final do período de análise, que correspondeu ao final da vida-útil para os produtos mantidos a temperatura ambiente e a 21 semanas de estocagem para os produtos mantidos sob refrigeração.

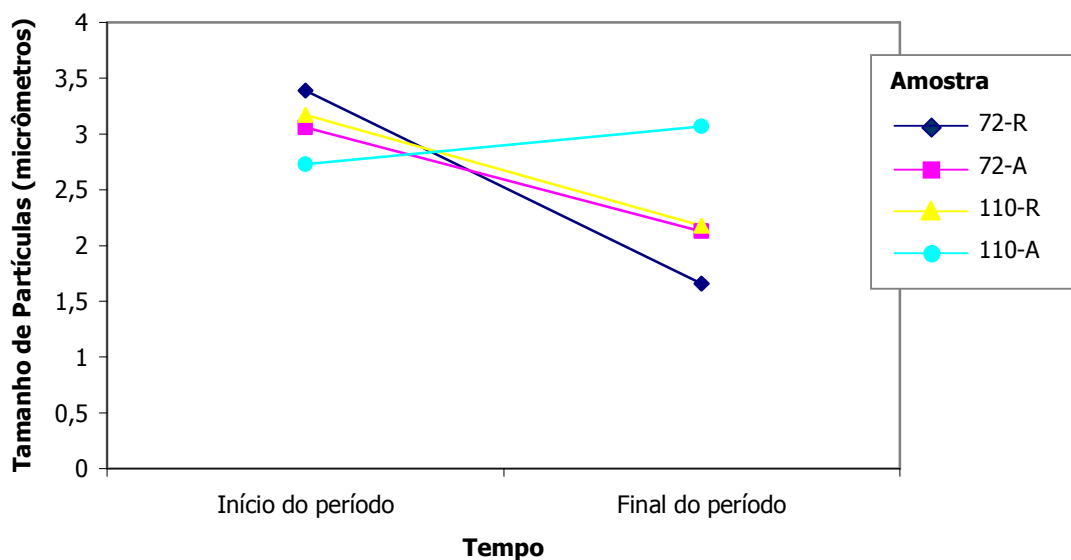


Figura 4.4.2. Tamanho de partículas (μm) das amostras no início da vida útil e ao final do período de análise.

O tamanho médio de partículas das bebidas lácteas manteve-se entre 1,5 e 3,5 μm , mesmo após 21 semanas de estocagem. Segundo Tsukahara (2005), para um produto apresentar estabilidade durante a vida útil, o tamanho médio das partículas deve estar entre 0,1 e 10 μm *. Lucey *et al.* (1999) observou que, bebidas lácteas visivelmente estáveis, com pouca separação de soro, apresentaram tamanho médio das partículas < 2 μm , em contraste com bebidas instáveis, com alta separação de soro (> 25%), que apresentaram tamanho de partículas > 20 μm .

O tamanho médio das partículas diminuiu ao longo do tempo, o que pode ser explicado por um rearranjo na estrutura, mesmo fator que pode ter influenciado a redução na porcentagem de sedimentação, já que partículas menores tendem a sedimentar menos. A diminuição foi mais significativa a temperatura de refrigeração, pois um dos produtos mantidos a temperatura ambiente, o de tratamento mais intenso, foi o único que apresentou ligeiro aumento. Segundo Lucey *et al.* (1999), maiores temperaturas de estocagem podem resultar em maior agregação das partículas devido à maior movimentação das partículas e, conseqüentemente, maior colisão entre as partículas. Isso significa que, após certo tempo, o produto pode perder sua estabilidade e suas partículas começarem a se agregar, o que pode ter sido o caso do produto 110-A, que poderia estar começando a perder sua estabilidade.

A Tabela 4.4.3 mostra imagens de microscopia óptica de um dos produtos (72-A) no início e final da vida-de-prateleira.

* Metodologia utilizada pela empresa Danisco A/S, Braband, Denmark, obtida através de comunicação pessoal.

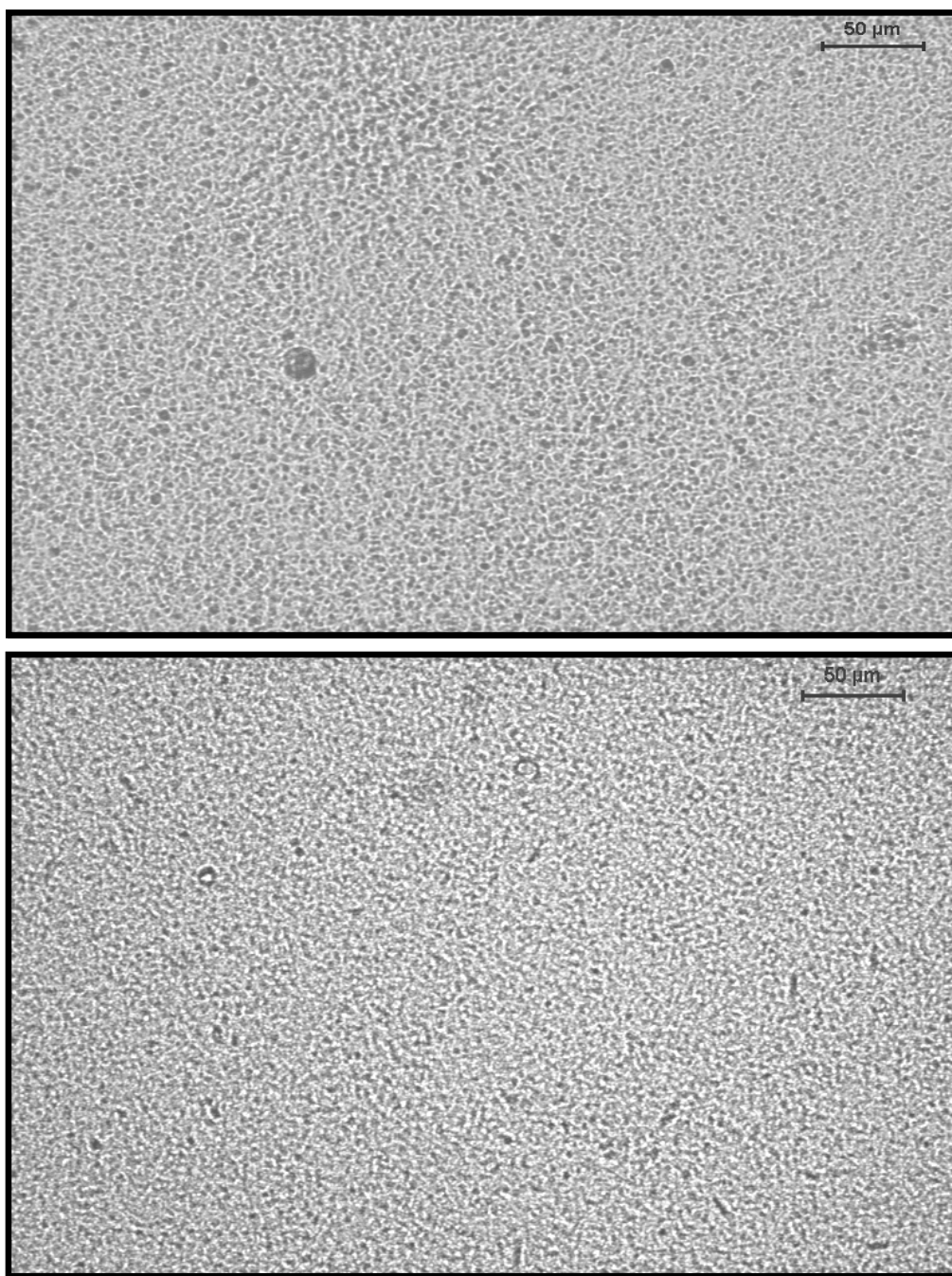


Figura 4.4.3. Fotos tiradas no microscópio óptico, aumento de 200x; amostra 72-A, início e final da vida-de-prateleira.

As fotos tiradas no microscópio óptico mostram partículas muito pequenas, com poucos agregados grandes. Pode-se observar também que as partículas no final da vida-de-prateleira apresentavam-se ligeiramente menores que no início. As partículas de

caseína observadas nas bebidas lácteas estáveis são agregados que restaram após a homogeneização (LUCHEY et al., 1999).

Segundo Lucey *et al.* (1999), a microscopia de bebidas com concentrações de pectina $\geq 0,3\%$ apresentou pequenas partículas de proteínas espalhadas. Com $0,2\%$ de pectina, alguns grandes agregados ($> 10\mu\text{m}$) puderam ser observados, mas sem estrutura de rede. Em baixas concentrações de pectina (ex. $\leq 0,1\%$) observou-se uma estrutura típica de gel, com grandes agregados de proteínas ($> 10\mu\text{m}$), muito parecida com a estrutura de bebidas sem pectina. As partículas observadas na Tabela 4.4.3 apresentam-se bem espalhadas, podendo ser comparadas às bebidas de máxima estabilidade na microscopia de Lucey *et al.* (1999).

A Tabela 4.4.3. apresenta a análise estatística da evolução da viscosidade dos iogurtes tratados termicamente com a temperatura e o tempo de estocagem.

Tabela 4.4.3. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para viscosidade.

Fatores	GL	VISCOSIDADE	
		QM	P
Tratamento Térmico	1	243,9948	0,2081
Erro(a)	1	28,0333	
Temperatura de Estocagem	1	54,1208	0,0675
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,2127	0,6613
Erro(b)	2	0,6137	
Tempo	7	6,2890	0,0022*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,5797	0,8884
Temperatura de Estocagem*Tempo	5	4,6265	0,0197*
Erro(c)	27	1,4185	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

A viscosidade foi influenciada pelo tempo e pela interação da temperatura de estocagem com o tempo. Quando a interação de duas variáveis exerce influência sobre o parâmetro analisado, deve-se analisar o efeito da interação, e não das variáveis independentemente. Assim, apenas a interação foi analisada neste caso. A Figura 4.4.4 mostra a evolução da viscosidade dos iogurtes ao longo do tempo e a Figura 4.4.5 mostra o efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo na viscosidade das bebidas lácteas.

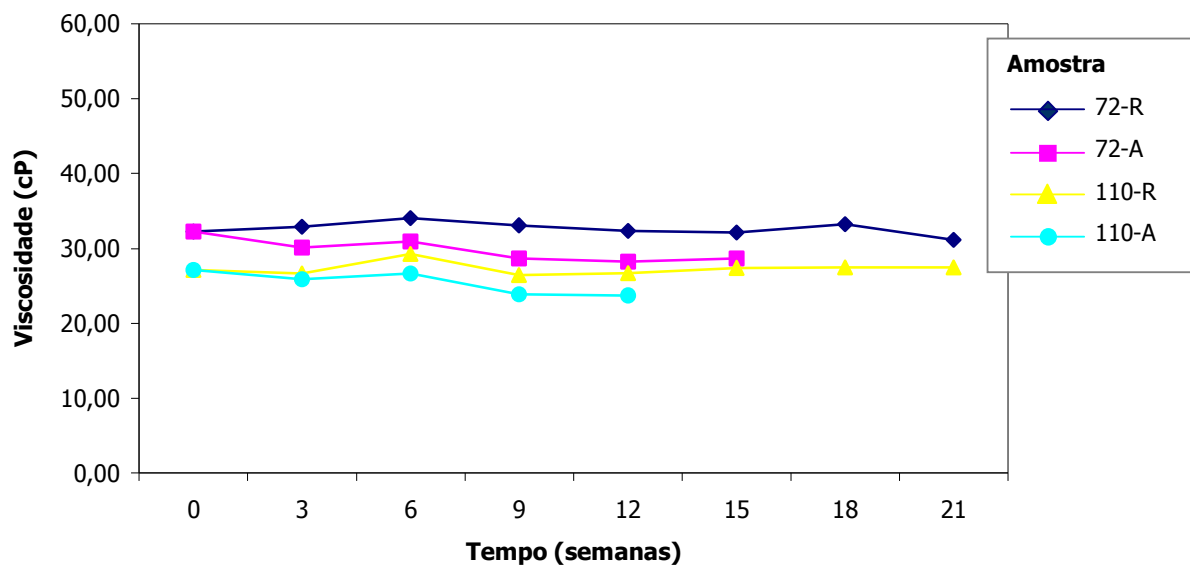


Figura 4.4.4. Viscosidade (cP) das amostras ao longo do tempo.

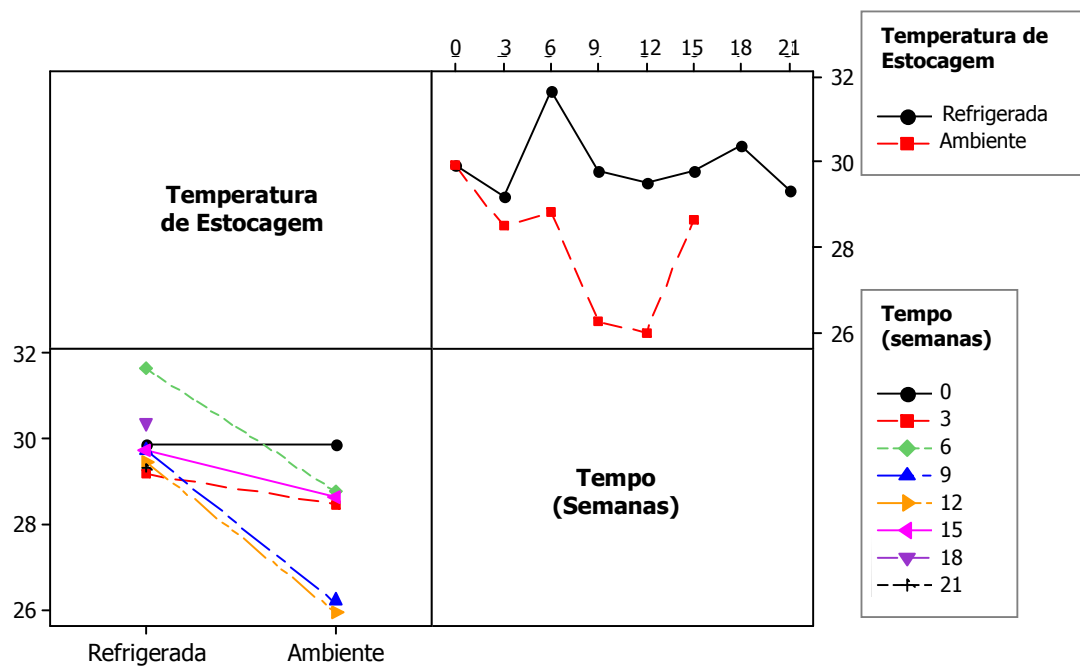


Figura 4.4.5. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo na viscosidade das amostras.

A viscosidade das bebidas lácteas apresentaram-se entre 23 e 30cP no caso do tratamento mais intenso, e entre 28 e 34cP para o tratamento de menor intensidade, sendo essa diferença não significativa estatisticamente. Para Laurent & Boulenguer (2003), bebidas lácteas acidificadas, existentes no mundo todo (como iogurtes líquidos, bebidas lácteas de frutas, bebidas com soja, bebidas com soro, kefir, etc.), apresentam estabilidade e viscosidade próximas ao do leite *in natura*. Segundo Glahn (1982), o tipo mais comum dessas bebidas, produzidas a base de iogurte, apresentam viscosidade abaixo de 50cP. Sendo assim, os valores obtidos estão ligeiramente abaixo do valor citado por Glahn (1982).

A temperatura de estocagem exerceu influência sob a viscosidade, sendo que, a temperatura ambiente, as bebidas lácteas apresentaram-se menos viscosas que sob refrigeração. A viscosidade das bebidas lácteas mantidas sob refrigeração foi praticamente constante durante todo o período analisado. Já as bebidas lácteas mantidas em condição ambiente, apresentaram uma queda na viscosidade, seguida de um aumento no final. Esse aumento, entretanto, não representa a média dos produtos, já que na 15ª semana um dos produtos não foi analisado, devido ao final de sua vida útil. Dessa forma, o ponto 15 da curva de estocagem ambiente passou a refletir a viscosidade de apenas uma das amostras, aparecendo no gráfico como um falso aumento.

A menor viscosidade apresentada pelos produtos estocados à temperatura ambiente provavelmente se deve a uma maior atividade proteolítica, já que algumas enzimas podem ter continuado ativas no produto, sendo favorecidas pela alta temperatura de estocagem (25-30°C). Segundo Kohlmann *et al.* (1991), proteases bacterianas são capazes de sobreviver ao tratamento térmico durante o processamento do leite e também são capazes de atuar em condições de estocagem refrigerada. Porém, a estocagem a temperatura ambiente promove condições mais próximas à ótima para a atividade dessas proteases.

4.5. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Cor das Bebidas Lácteas

O esquema de cores do sistema CIE $L^*a^*b^*$ está representado na Figura 4.5.1 para facilitar a visualização dos resultados.

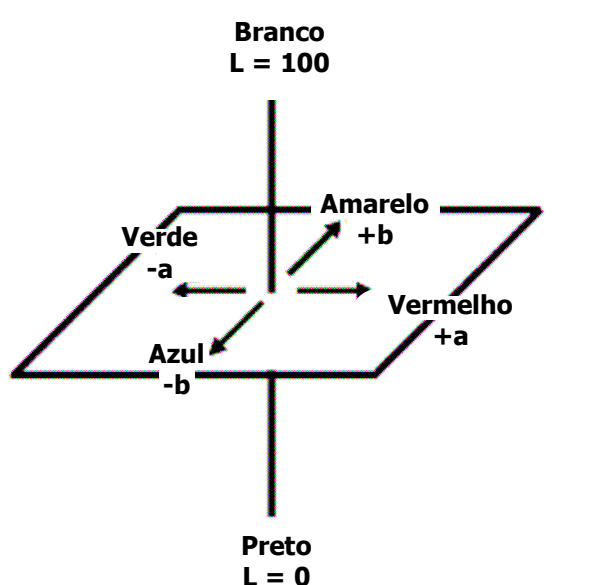


Figura 4.5.1. Esquema de cores do sistema CIE $L^*a^*b^*$.

A Tabela 4.5.1 apresenta a análise estatística para os efeitos do tratamento térmico, temperatura e tempo de estocagem no parâmetro L^* (luminosidade) das bebidas lácteas.

Tabela 4.5.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro L*.

Fatores	GL	Parâmetro L*	
		QM	P
Tratamento Térmico	1	4,2028	0,0746
Erro(a)	1	0,0116	
Temperatura de Estocagem	1	0,7467	0,0229*
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,0038	0,6891
Erro(b)	2	0,0177	
Tempo	7	0,5980	< 0,0001*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,1163	< 0,0001*
Temperatura de Estocagem*Tempo	6	0,0576	< 0,0001*
Erro(c)	30	0,0081	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

O parâmetro L* foi influenciado pela temperatura de estocagem, pelo tempo, e pelas interações do tratamento térmico com o tempo e da temperatura de estocagem com o tempo, sendo apenas as interações analisadas.

A Figura 4.5.2 mostra a evolução do parâmetro L* ao longo do tempo e as Figuras 4.5.3 e 4.5.4 mostram o efeito das interações do tratamento térmico com o tempo e da temperatura de estocagem com o tempo nos valores de L*, respectivamente. Em todos os gráficos, o primeiro ponto representa a cor do iogurte antes de sofrer o tratamento térmico e o tempo 0 representa a cor das amostras logo após o tratamento, antes de serem estocadas.

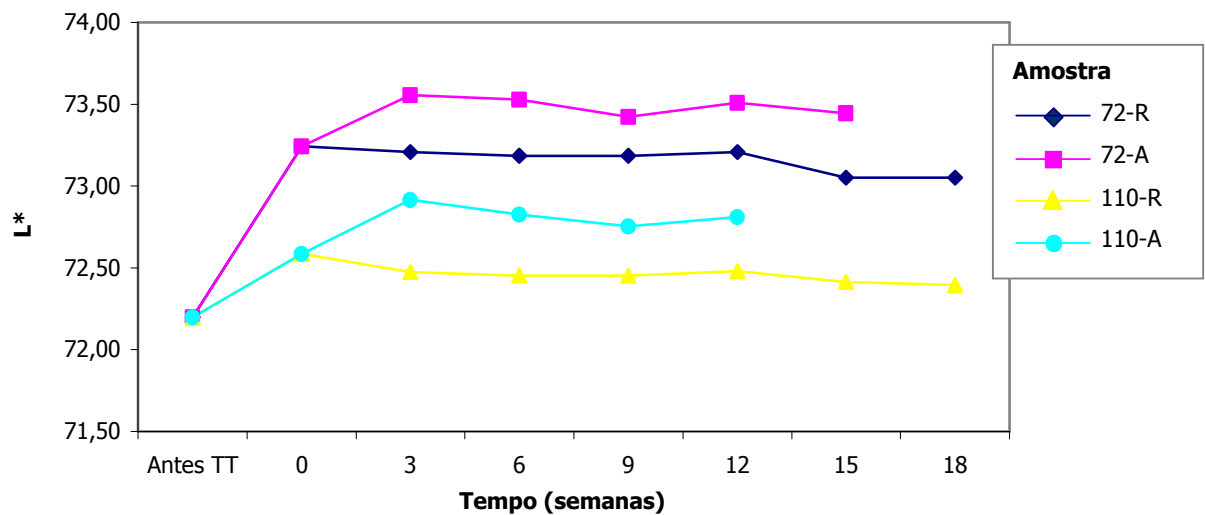


Figura 4.5.2. Evolução do parâmetro L^* ao longo do tempo para as diferentes amostras.

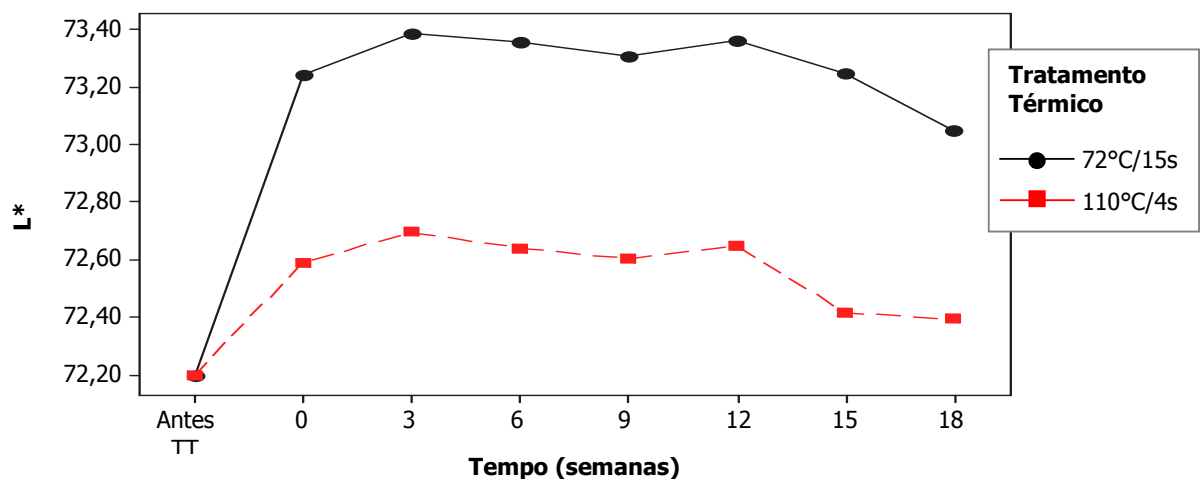


Figura 4.5.3. Efeito da interação do tratamento térmico com o tempo no parâmetro L^* .

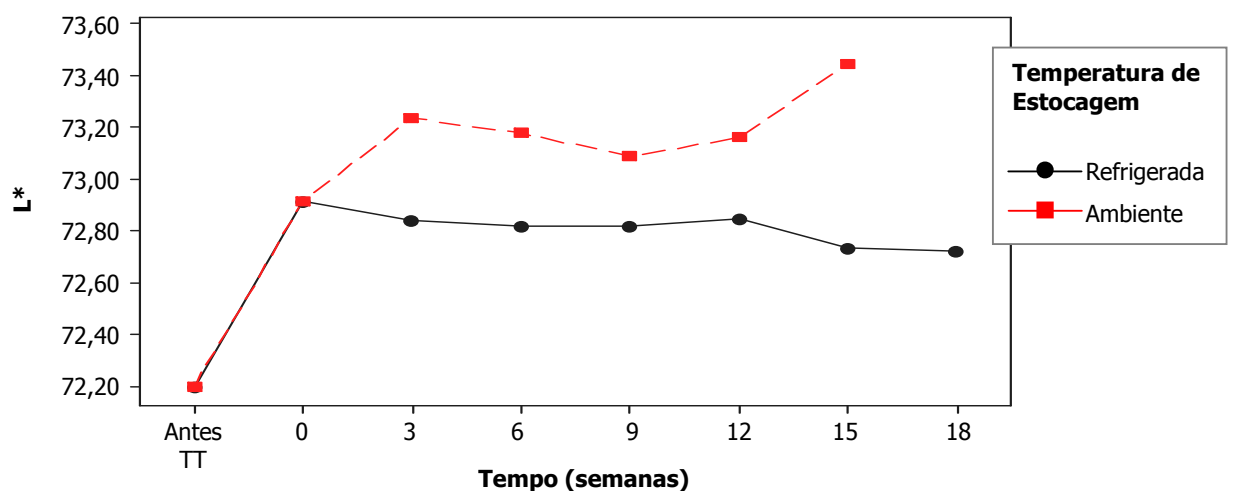


Figura 4.5.4. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo no parâmetro L^* .

Nota-se que para todos os produtos houve um aumento da luminosidade (parâmetro L^*) após o tratamento térmico, provavelmente devido à diminuição do tamanho das partículas das bebidas lácteas devido à homogeneização (Figura 4.5.2).

O aumento foi maior no tratamento mais brando ($72^{\circ}\text{C}/15\text{s}$), mas o comportamento das curvas de luminosidade ao longo do tempo foi semelhante, mantendo-se constante após o tratamento, até a 12ª semana, quando a luminosidade passou a diminuir (Figura 4.5.3).

Com relação à temperatura de estocagem, nota-se que, à temperatura de refrigeração, a luminosidade manteve-se constante durante todo o período de armazenamento, enquanto que, em condição ambiente, a luminosidade continuou aumentando no início da estocagem (até a 3ª semana), mantendo-se praticamente constante até a 12ª semana, quando passou a aumentar novamente (Figura 4.5.4).

Essa mudança no comportamento das curvas após a 12ª semana, observada nos gráficos de variação estatística, pode ser explicada pelo fim das análises das amostras mantidas à temperatura ambiente, devido ao final de sua vida útil. Como as curvas representam o comportamento médio das amostras de um mesmo tratamento ou de mesma condição de estocagem, no ponto em que alguma das amostras não apresenta mais resultados, o comportamento da curva passa a refletir apenas o de uma delas, sofrendo alterações, que aparecem nos gráficos como falsas tendências.

O fato do aumento da luminosidade ter sido menor no tratamento mais intenso ($110^{\circ}\text{C}/4\text{s}$) pode ser devido a uma maior degradação do corante adicionado, resultando em alteração da cor.

Com relação à temperatura de estocagem, a exposição das embalagens à luz, no caso dos produtos estocados em condições ambientes, pode ter contribuído para uma maior 'palidez' das amostras.

A Tabela 4.5.2 apresenta os dados estatísticos obtidos para o parâmetro a^* (verde-vermelho).

Tabela 4.5.2. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro a*.

Fatores	GL	Parâmetro a*	
		QM	P
Tratamento Térmico	1	0,1966	0,5742
Erro(a)	1	0,3147	
Temperatura de Estocagem	1	4,7802	0,0004*
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,0284	0,0594
Erro(b)	2	0,0018	
Tempo	7	1,8020	< 0,0001*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,0112	0,1603
Temperatura de Estocagem*Tempo	6	0,4161	< 0,0001*
Erro(c)	30	0,0068	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

O parâmetro a* foi influenciado pela temperatura de estocagem, pelo tempo e pela interação das duas variáveis. Como a interação foi significativa, analisou-se o efeito conjunto do tempo e temperatura de estocagem, uma vez que são variáveis interdependentes.

A Figura 4.5.5 mostra a evolução valores de a* das bebidas lácteas ao longo do tempo, e a Figura 4.5.6 apresenta a influência da interação da temperatura de estocagem com o tempo nos resultados obtidos.

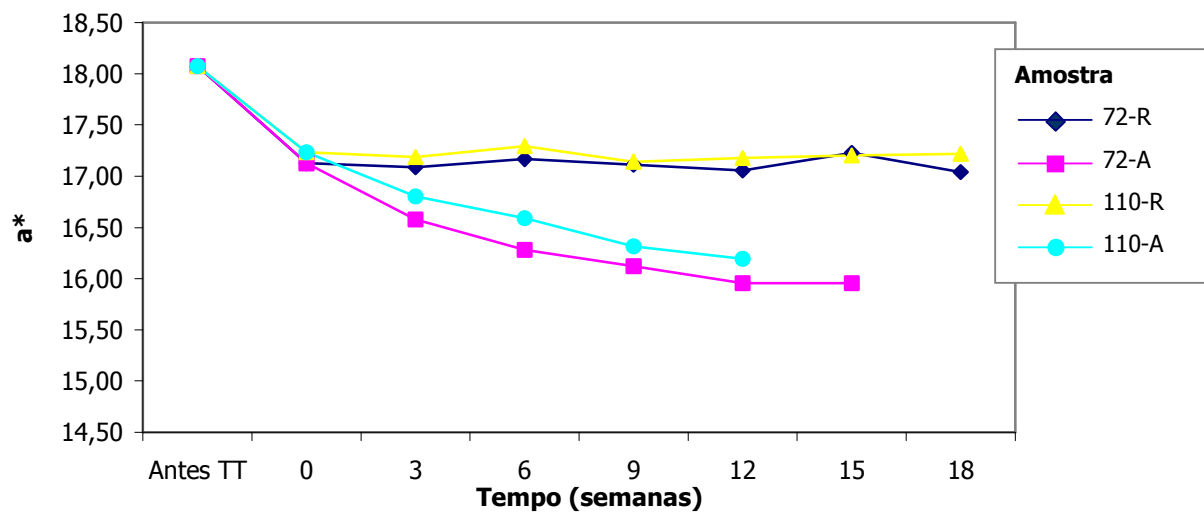


Figura 4.5.5. Evolução do parâmetro a^* ao longo do tempo para as diferentes amostras.

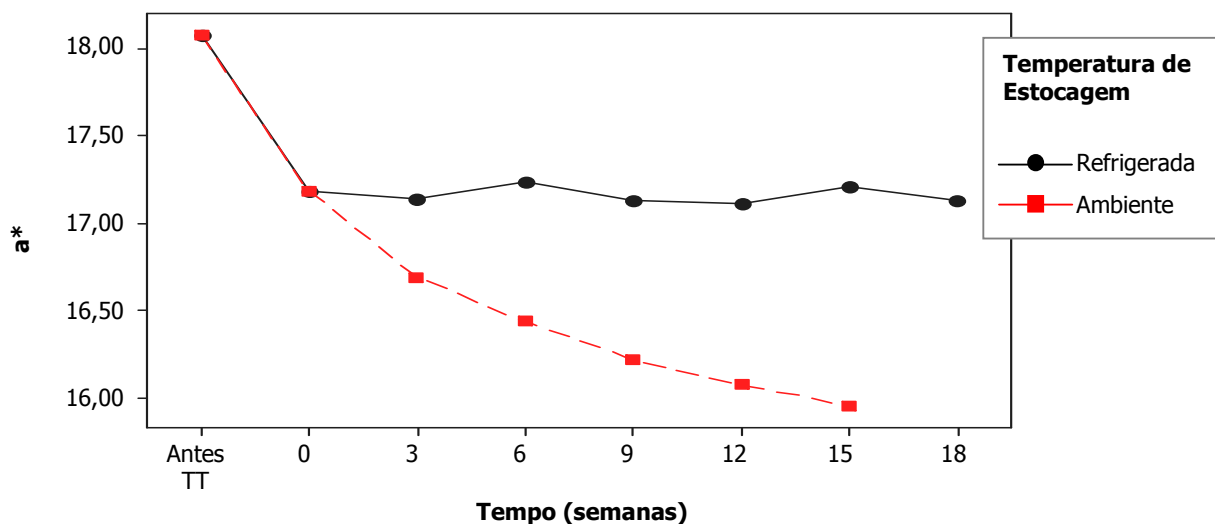


Figura 4.5.6. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo no parâmetro a^* .

Houve uma diminuição no valor de a^* , para todas as amostras, após os tratamentos térmicos, ou seja, uma diminuição da coloração vermelha, o que pode ser atribuído à degradação do corante pelo tratamento térmico. Entretanto, a intensidade do tratamento térmico utilizado não afetou a intensidade da perda de coloração vermelha, sendo que nos dois tratamentos essa diminuição foi bastante semelhante (Figura 4.5.5).

Também foi possível observar que, à temperatura de refrigeração, a coloração vermelha manteve-se constante, enquanto que, sob condições ambientes, houve uma

perda constante de coloração, provavelmente devido à aceleração de reações de degradação devido à temperatura mais elevada de estocagem. Além disso, a iluminação do ambiente onde foram mantidas as embalagens também pode ter influenciado na degradação do corante, apesar do uso de embalagens opacas.

A Tabela 4.5.3 apresenta os dados estatísticos obtidos para o parâmetro b^* (azul-amarelo).

Tabela 4.5.3. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para o parâmetro b^* .

Fatores	GL	Parâmetro b^*	
		QM	P
Tratamento Térmico	1	2,6017	0,0340*
Erro(a)	1	0,0074	
Temperatura de Estocagem	1	9,6430	0,0081*
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,2945	0,1936
Erro(b)	2	0,0792	
Tempo	7	2,5979	< 0,0001*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,0941	< 0,0001*
Temperatura de Estocagem*Tempo	6	0,7858	< 0,0001*
Erro(c)	30	0,0112	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

O tratamento térmico, a temperatura de estocagem, o tempo e as interações do tratamento térmico com o tempo e da temperatura de estocagem com o tempo influenciaram o comportamento do parâmetro b^* das amostras.

A evolução do parâmetro b^* das amostras ao longo do tempo e a influência das interações do tratamento térmico com o tempo e da temperatura de estocagem com o tempo estão apresentadas nas Figuras 4.5.7, 4.5.8 e 4.5.9, respectivamente.

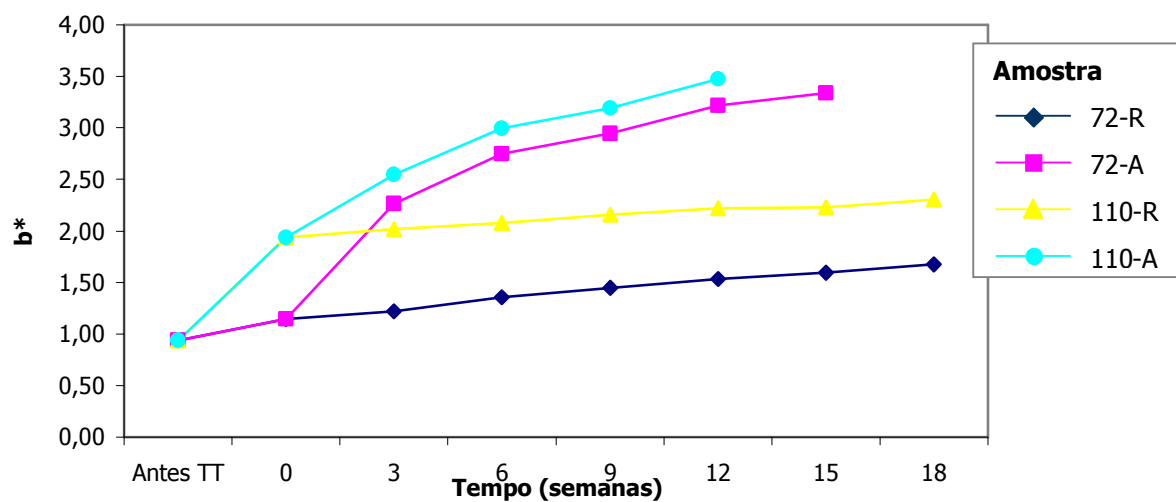


Figura 4.5.7. Evolução do parâmetro b^* ao longo do tempo para as diferentes amostras.

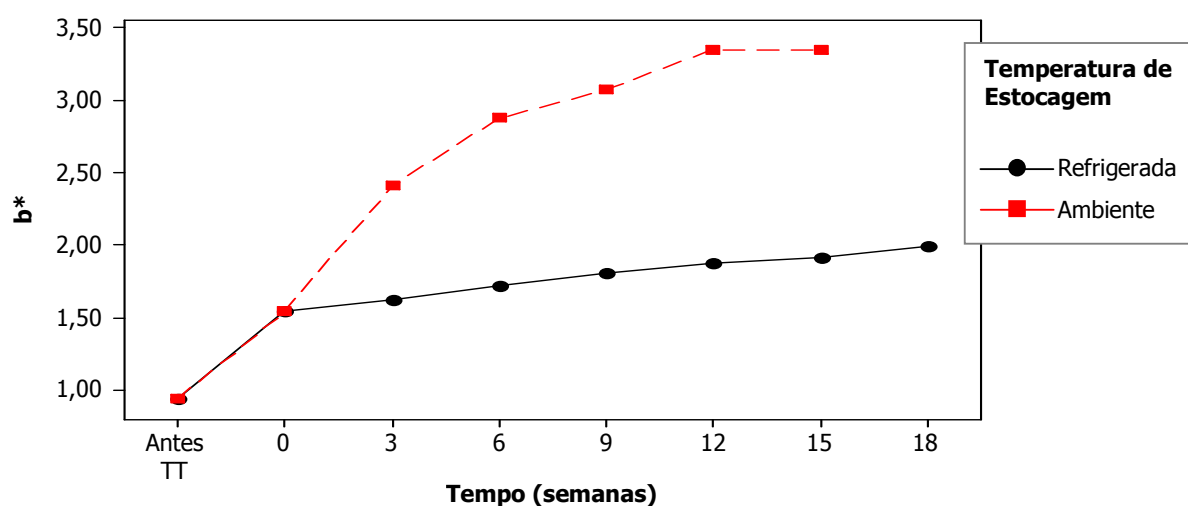


Figura 4.5.8. Efeito da interação do tratamento térmico com o tempo no parâmetro b^* .

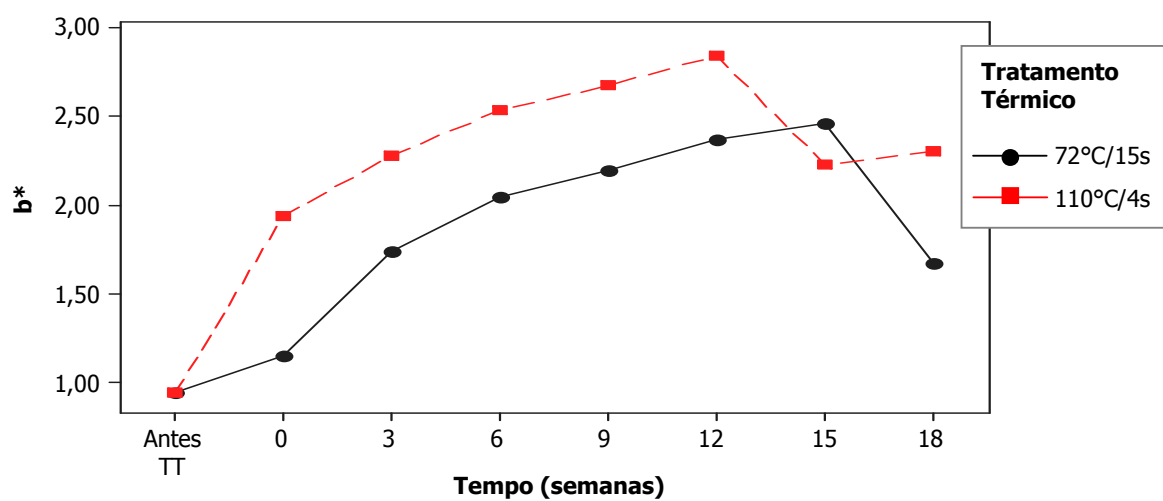


Figura 4.5.9. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo no parâmetro b^* .

O parâmetro b^* aumentou após os tratamentos térmicos, tendo sido esse aumento maior para o tratamento mais intenso (Figura 4.5.8). Isso pode ser atribuído à reação de Maillard, com formação de pigmentos amarelados, que tende a ser mais intensa quanto mais elevada for a temperatura utilizada no tratamento térmico. O aumento do valor de b^* continuou ocorrendo durante a estocagem, a taxas semelhantes para os produtos de diferentes tratamentos térmicos.

A mudança de comportamento nas curvas relativas aos diferentes tratamentos térmicos (Figura 4.5.8) após 12 e 15 semanas também se relacionam ao término da vida útil das amostras mantidas à temperatura ambiente, fazendo com que as curvas passassem a refletir o comportamento de apenas uma das amostras, assim como ocorreu com o parâmetro L^* .

Com relação à temperatura de estocagem, o aumento de b^* ocorreu mesmo sob refrigeração, mas de forma lenta, ocorrendo de forma muito mais intensa na estocagem ambiente, o que reforça a possibilidade de ocorrência de Maillard.

4.6. Efeito do Tratamento Térmico, Temperatura de Estocagem e Tempo de Armazenamento na Avaliação Sensorial das Bebidas Lácteas: Aparência, Viscosidade, Sabor, Impressão Global e Intenção de Compra

As Tabelas 4.6.1 e 4.6.2 exibem os dados obtidos na análise estatística dos resultados dos testes de aceitação (aparência, viscosidade, sabor e impressão global) e intenção de compra (considerando-se a média da avaliação), realizados durante 21 semanas ou até que um ou mais atributos atingisse nota média próxima a 5,0.

Tabela 4.6.1. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para análise sensorial: aparência, sabor e viscosidade.

Fatores	GL	APARÊNCIA		VISCOSIDADE		SABOR	
		QM	P	QM	P	QM	P
Tratamento Térmico	1	0,1582	0,5107	0,3828	0,1418	0,8235	0,1872
Erro(a)	1	0,1692		0,0196		0,0755	
Temperatura de Estocagem	1	3,1354	0,0207*	0,6887	0,0492*	11,2746	0,0086*
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,0004	0,7816	0,0390	0,4106	0,1031	0,4129
Erro(b)	2	0,0033		0,0366		0,0980	
Tempo	7	0,1924	0,0048*	0,0833	0,0184*	0,4542	0,0015*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,238	0,8324	0,0065	0,9711	0,0240	0,9660
Temperatura de Estocagem*Tempo	5	0,3166	0,0005*	0,0540	0,1168	0,7988	< 0,0001*
Erro(c)	25	0,0485		0,0273		0,0943	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

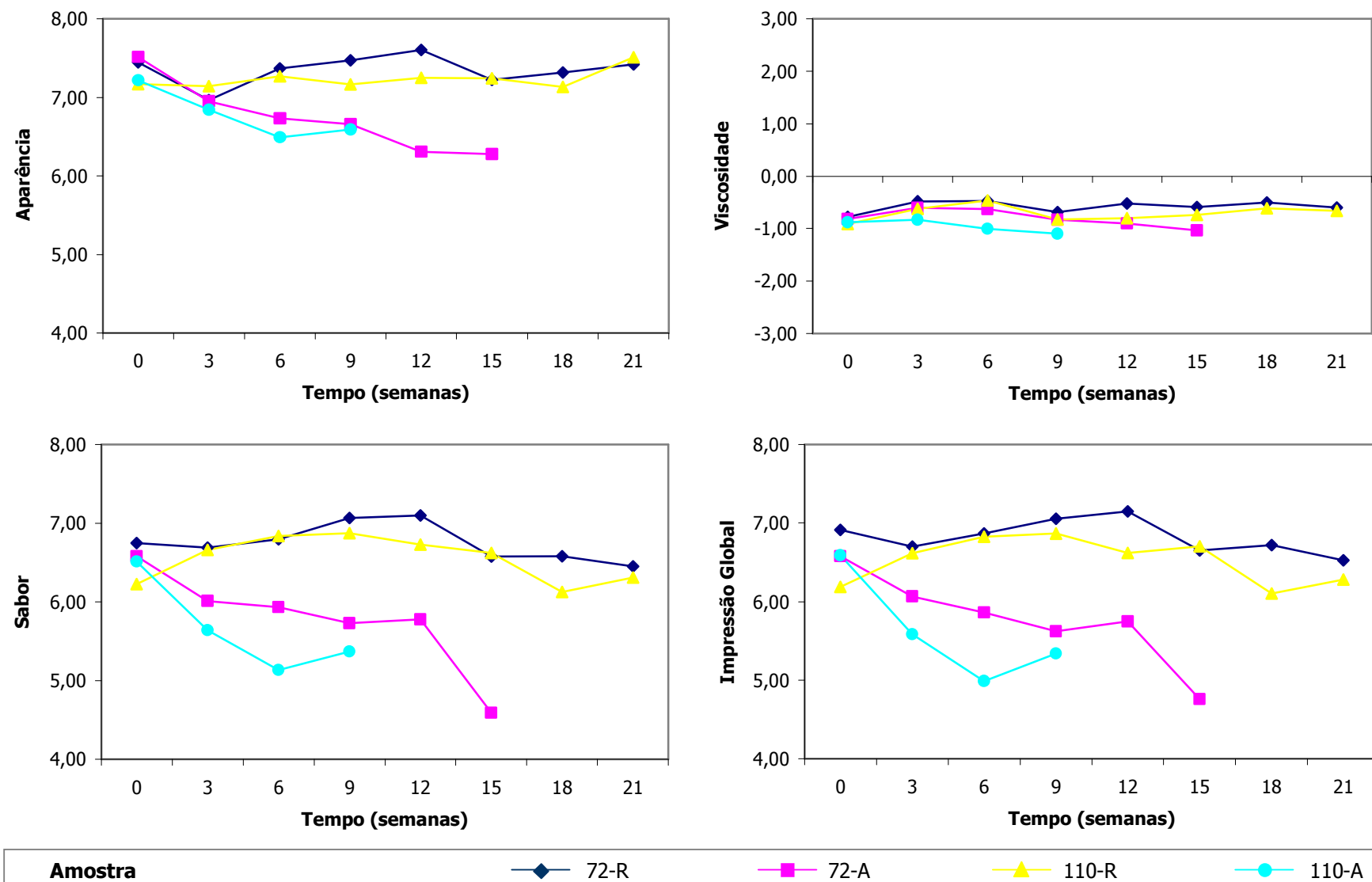
Tabela 4.6.2. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para análise sensorial: impressão global e intenção de compra.

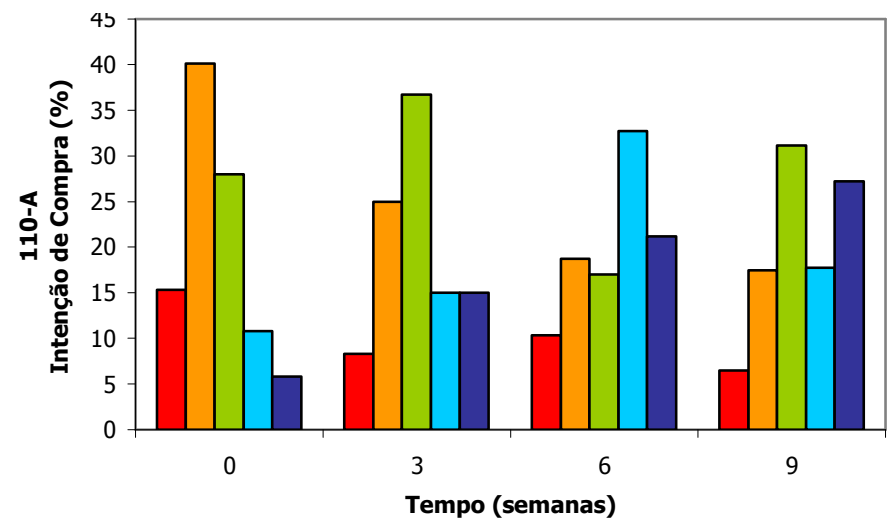
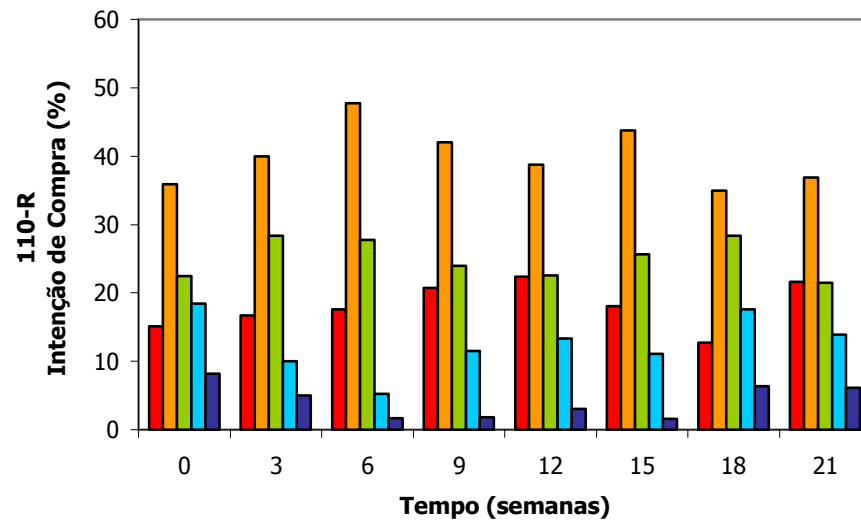
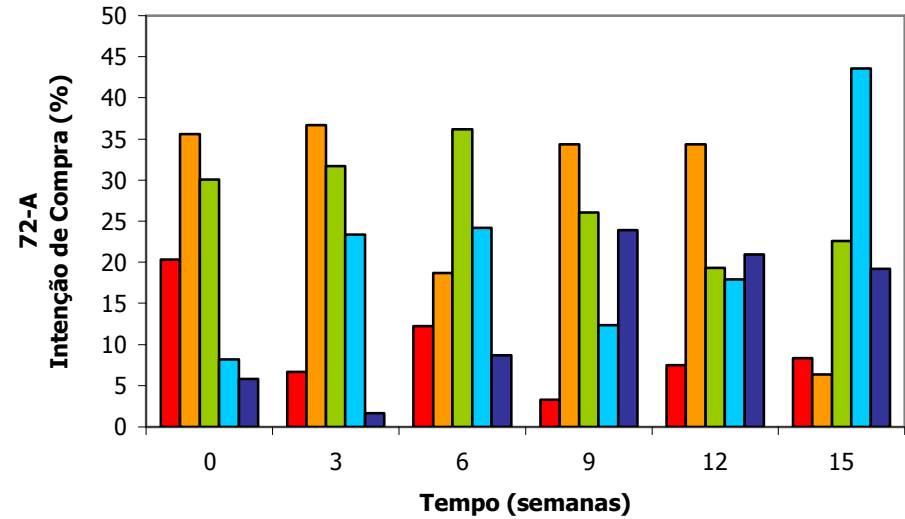
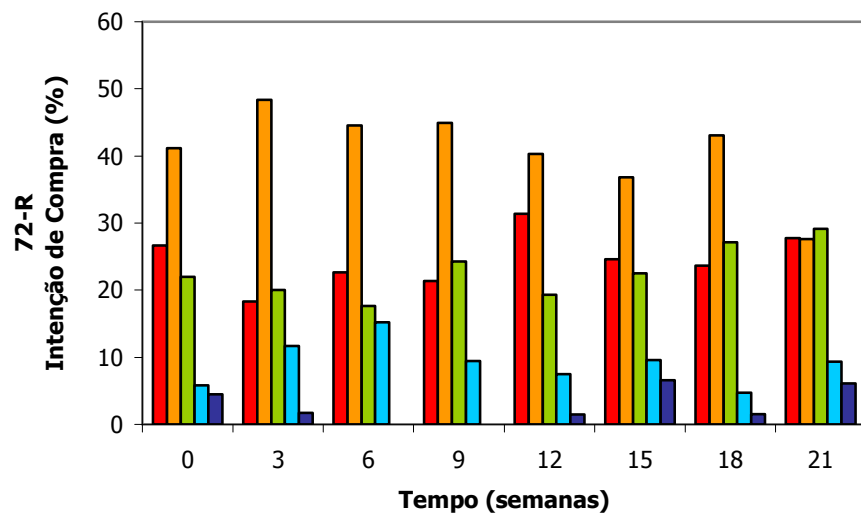
Fatores	GL	IMPRESSÃO GLOBAL		INTENÇÃO DE COMPRA	
		QM	P	QM	P
Tratamento Térmico	1	0,9225	0,2502	0,3756	0,3083
Erro(a)	1	0,1585		0,1039	
Temperatura de Estocagem	1	11,8964	0,0069*	4,7878	0,0129*
Tratamento Térmico*Temperatura de Estocagem	1	0,0356	0,5790	0,0068	0,7737
Erro(b)	2	0,0825		0,0631	
Tempo	7	0,4195	0,0005*	0,1373	0,0167*
Tratamento Térmico*Tempo	7	0,0384	0,8037	0,0232	0,8061
Temperatura de Estocagem*Tempo	5	0,7586	< 0,0001*	0,3575	0,0001*
Erro(c)	27	0,0725		0,0441	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; P = probabilidade

A interação da temperatura de estocagem com o tempo influenciou a aparência e o sabor e, conseqüentemente, a impressão global e intenção de compra. A avaliação da viscosidade foi afetada pela temperatura de estocagem e pelo tempo.

A Figura 4.6.1 apresenta os resultados obtidos na avaliação sensorial periódica dos atributos aparência, sabor, viscosidade e impressão global e a Figura 4.6.2 traz os resultados obtidos na intenção de compra por amostra.





■ Certamente compraria
 ■ Provavelmente compraria
 ■ Tenho dúvidas se compraria ou não
 ■ Provavelmente não compraria
 ■ Certamente não compraria

Figura 4.6.2. Evolução da intenção de compra (%) ao longo do tempo (21 semanas) para cada uma das amostras.

A avaliação da aparência manteve-se praticamente constante nos produtos estocados sob refrigeração (notas 7,0 – 7,5) e apresentou ligeira queda nos produtos estocados à temperatura ambiente, atingindo médias próximas a 6,5 quando considerado o final da vida-útil. Portanto, conclui-se que a aparência, apesar de influenciar na aceitação do produto, não foi o fator determinante da vida útil. Como todos os produtos não apresentaram problemas de estabilidade física, o fator que mais influenciou na aceitação da aparência foi provavelmente a cor. A Figura 4.6.3 mostra o efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo na avaliação da aparência.

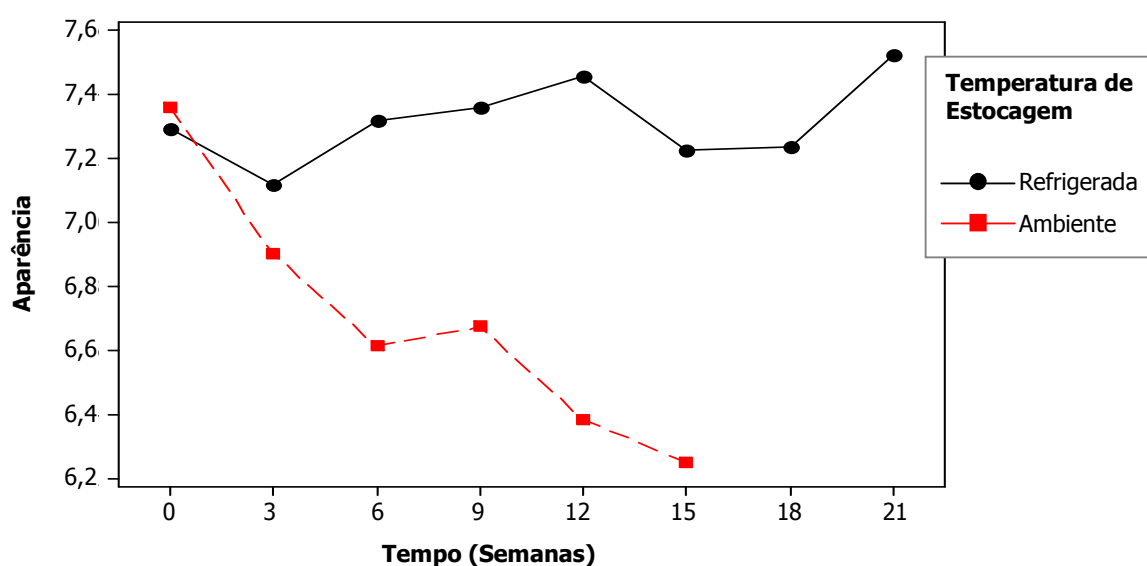


Figura 4.6.3. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo na avaliação de aparência.

O fato da intensidade do tratamento térmico não ter influenciado a aceitação da aparência leva ao estabelecimento de uma relação entre a aceitação e a coloração vermelha, único parâmetro de cor que não foi influenciado pela intensidade do tratamento térmico.

Portanto, é razoável supor que a perda de coloração vermelha, que ocorreu ao longo do tempo de estocagem para os produtos estocados à temperatura ambiente, foi o fator de maior influência na diminuição da aceitação da aparência dos iogurtes. Além disso, as curvas de aparência (Figura 4.6.3) apresentaram comportamento muito semelhante às do parâmetro a^* (Figura 4.5.6), com relativa constância nos produtos refrigerados e decréscimo constante nos produtos mantidos à temperatura ambiente. O

parâmetro b^* também pode ter exercido certa influência, já que o aumento de b^* (Figura 4.5.9), ou seja, aumento de amarelo, nos produtos estocados à temperatura ambiente, também pode estar relacionado à diminuição da aceitação da aparência (Figura 4.6.3).

A influência do tempo e da temperatura de estocagem na avaliação da viscosidade está demonstrada na Figura 4.6.4.

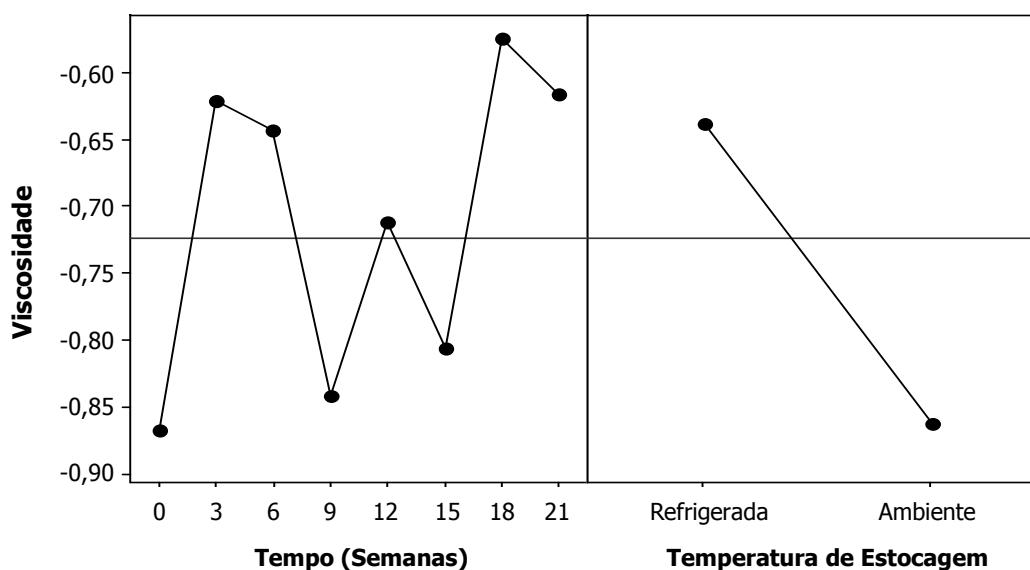


Figura 4.6.4. Efeitos da temperatura de estocagem e do tempo na avaliação da viscosidade.

A avaliação da viscosidade apresentou grande variação, dando a impressão de ser um atributo de difícil percepção pelos provadores, já que todas as amostras apresentavam viscosidades próximas. Entretanto, pode ser observado que as médias estiveram sempre abaixo do ideal (Figura 4.6.1), indicando a preferência dos provadores por bebidas um pouco mais viscosas. Apesar da dificuldade no julgamento, a diferença na viscosidade das bebidas estocadas à temperatura ambiente e sob refrigeração foi sensorialmente perceptível.

Um aumento da viscosidade, sem mudanças na estabilidade física e sabor dos produtos provavelmente aumentaria ainda mais a aceitação sensorial do produto. Isso poderia ser alcançado pelo uso de uma homogeneização à pressão mais baixa e pelo uso de espessantes.

A Figura 4.6.5 mostra a influência da interação da temperatura de estocagem com o tempo nas avaliações de sabor, impressão global e intenção de compra.

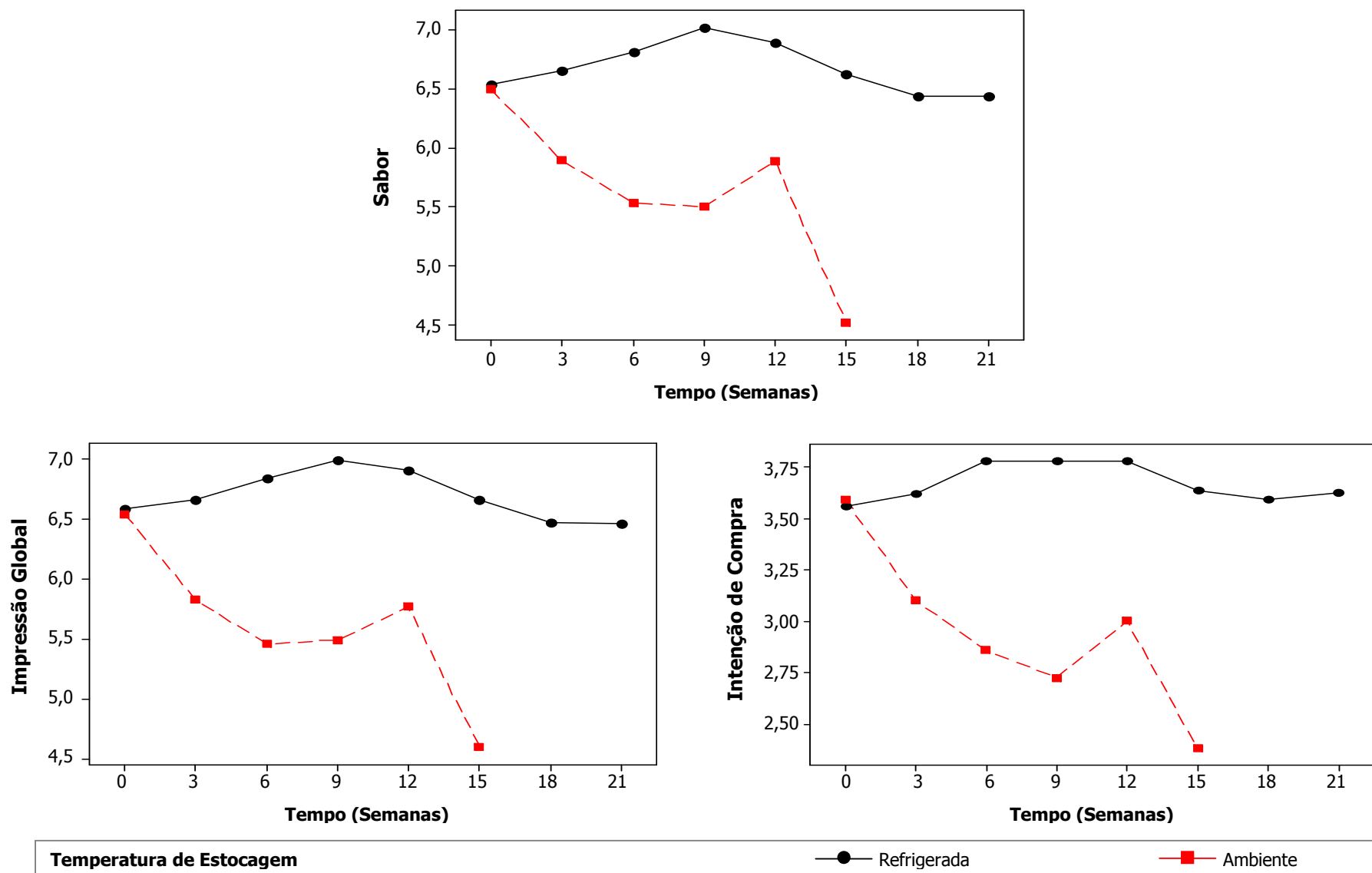


Figura 4.6.5. Efeito da interação da temperatura de estocagem com o tempo nas avaliações de sabor, impressão global e intenção de compra.

Houve grande semelhança entre as curvas de sabor com a impressão global e a intenção de compra (Figuras 4.6.1 e 4.6.5), indicando que o sabor foi o fator que mais influenciou a aceitação das bebidas pelos provadores, além de ser o fator que determinou a vida-de-prateleira dos produtos.

Notas próximas a 5,0 foram obtidas para o sabor (Figura 4.6.1) e, conseqüentemente, impressão global, após 9 semanas (2 meses) de estocagem ambiente para o produto de tratamento mais intenso (110-A) e 15 semanas (3 meses e meio) para o produto de tratamento menos intenso (72-A), sendo estes tempos considerados como o limite da vida-útil para estas amostras.

Para as amostras estocadas sob refrigeração (Figura 4.6.1), após 21 semanas de análise as notas de sabor e impressão global ainda se mantinham próximas a 6,5, e em tendência de queda bastante lenta, o que indica que a vida-de-prateleira desses produtos possivelmente se estenderia por um tempo prolongado, além dos 5 meses de estudo.

Os histogramas de barras para intenção de compra (Figura 4.6.2) reforçam esses dados. Observa-se claramente a diminuição da aceitação (certamente compraria e provavelmente compraria) e aumento da rejeição (certamente não compraria e provavelmente não compraria) nas amostras estocadas a temperatura ambiente após 15 semanas para a amostra 72-A e 9 semanas para a amostra 110-A. Já para as amostras estocadas sob refrigeração observa-se aceitação elevada em relação à rejeição para ambos os produtos, mesmo após as 21 semanas de estudo.

É possível notar, nos produtos estocados sob refrigeração (Figura 4.6.5), uma melhora na aceitação após as 3 primeiras semanas de estocagem, seguida de uma tendência de declínio após a 12ª semana. Esse comportamento pode ter sido resultado do aparecimento de *off-flavors* no tratamento térmico, que tenderam a desaparecer, antes que se iniciasse a formação de novos *off-flavors*, esses sim responsáveis pela determinação do final da vida-útil. Segundo Valero *et al.* (2001) o leite UHT recém-produzido realmente possui um leve sabor a cozido, que mais tarde tende a diminuir, evoluindo para um sabor fraco, com a possibilidade de desenvolvimento de outros *off-flavors*. Maarse (1991) afirma que o sabor de cozido formado durante o aquecimento tendeu a desaparecer após 4 semanas de estocagem.

A aceitação dos iogurtes foi decrescendo com o tempo de estocagem quando os produtos foram armazenados à temperatura ambiente, o que leva a crer que à

temperaturas mais altas, predominam outras reações que levam a formação de novos *off-flavors* ou ocorre uma aceleração das mesmas reações, levando a formação mais rápida de compostos de sabor desagradável.

Apesar do tratamento térmico não ter influenciado estatisticamente a avaliação do sabor, o fato da vida-de-prateleira da amostra 110-A (tratamento térmico mais intenso) ter sido mais curta que da amostra 72-A (tratamento térmico mais brando) (Figura 4.6.1), além da amostra 72-R ter recebido notas ligeiramente maiores que a amostra 110-R durante todo o período analisado, torna evidente que a alteração de sabor que reduziu a aceitação deve estar relacionada ao tratamento térmico. Segundo Maarse (1991), as proteínas e a lactose podem ser importantes fontes para a formação de compostos de sabor no leite (MAARSE, 1991).

As proteínas do soro são fontes de componentes sulfurados, os quais são os principais responsáveis por aromas associados ao tratamento térmico (BODYFELT *et al.*, 1988). O sabor típico do leite UHT é devido principalmente à formação de H₂S (WALSTRA *et al.*, 2006; MAARSE, 1991). Segundo Walstra *et al.* (2006), o tratamento térmico moderado do leite (ex. 75°C / 20s) causa uma diminuição no aroma característico do leite cru, resultando em um produto com pouco aroma. Tratamentos mais intensos (ex. 80 – 100°C / 20s) resultam em sabor de “cozido”, devido à formação de H₂S. Tratamentos térmicos ainda mais intensos (ex. 115°C / 10 – 15min) podem resultar em sabor de “esterilizado”.

Durante o aquecimento do leite, a lactose também sofre mudanças que resultam em importantes conseqüências no leite, como alterações de aroma e cor. A lactose é um açúcar redutor, capaz de reagir com grupos amino (geralmente fornecidos pela lisina no leite) na reação de Maillard. Quando o aquecimento do leite não é muito intenso, a lactose pode se isomerizar a outros açúcares, além de se degradar em galactose e derivados da glicose, como ácidos orgânicos. Em tratamentos mais intensos, a reação de Maillard tem um papel importante. Os resultados são alterações no aroma, desenvolvimento de uma cor marrom e formação de melanoidinas (WALSTRA *et al.*, 2006).

Dessa forma, conclui-se que a aplicação de um tratamento térmico mais brando que os utilizados, como uma termização, por exemplo, poderia prolongar ainda mais a aceitação sensorial dos produtos, e continuar garantindo a estabilidade microbiológica, por se tratar de um produto de pH baixo.

O fato da temperatura de estocagem ter tido uma influência tão clara na aceitação do sabor e, conseqüentemente, na determinação da vida-de-prateleira dos produtos, nos leva a pensar que outros fatores também possam ter desencadeado o desenvolvimento de *off-flavors*, além do tratamento térmico. A reação de Maillard, por exemplo, pode ter continuado a ocorrer durante a estocagem, tendo sido favorecida pela alta temperatura na condição ambiente. Isso explica também o aumento da coloração amarela nos produtos estocados sem refrigeração, como discutido na seção 4.5.

Segundo Valero *et al.* (2001), diferentes fatores que também afetam a evolução dos componentes voláteis em leite UHT incluem a exposição a luz fluorescente, oxigênio e temperatura de estocagem (VALERO *et al.*, 2001).

A formação de compostos sulfurados, além de ocorrer no aquecimento, pode ocorrer também quando o leite é exposto à luz, através da quebra das proteínas do soro em peptídeos, reação catalisada pela riboflavina. A velocidade da reação depende da intensidade e comprimento de onda, da translucência do material de embalagem e da duração da exposição (Maarse, 1991). Apesar de terem sido utilizadas garrafas brancas e opacas, o local de estocagem recebia iluminação diurna, o que pode ter desencadeado essa reação mesmo que a uma velocidade bastante lenta.

Além disso, o ataque de enzimas proteolíticas às caseínas pode ter gerado a formação de peptídeos de sabor amargo nos produtos estocados em condições ambientes. Como já foi discutido (seção 4.4), as proteinases bacterianas, em particular, podem representar um problema devido à sua termoestabilidade muito elevada (MAARSE, 1991).

A alta acidez do produto foi um fator bastante citado pelos provadores como sendo um defeito de sabor, apesar de não ter variado ao longo do tempo. O uso de pHs mais elevados, até o limite máximo de atuação ótima da pectina, poderia resultar em aumento da aceitação durante toda a vida-de-prateleira dos produtos.

O aromatizante utilizado também pode ter sofrido alteração no tratamento térmico. Dessa forma, um teste de estabilidade térmica de diferentes aromatizantes pode facilitar a escolha do aroma a ser utilizado. O uso de polpa de frutas no lugar de aromas artificiais também poderia aumentar a aceitação do sabor.

5. CONCLUSÃO

Todos os iogurtes apresentaram excelente estabilidade física e microbiológica. Ambos os tratamentos utilizados (72°C/15s e 110°C/4s) foram eficientes na redução das bactérias lácticas e de bolores e leveduras, não havendo crescimento microbiológico nem mesmo nos iogurtes estocados à temperatura ambiente. A intensidade do tratamento e a temperatura de estocagem também não afetaram a estabilidade física, sendo que a sedimentação se manteve baixa durante todo o período estudado, e nenhum produto apresentou sinérese ou aumento brusco do tamanho de partículas.

O parâmetro que determinou o fim da vida-de-prateleira das bebidas foi o sabor. Tanto a intensidade do tratamento térmico quanto a temperatura de estocagem influenciaram a aceitação do sabor, sendo que, dentre os produtos estocados à temperatura ambiente, o iogurte tratado a 110°C/4s apresentou fim da vida útil com 2 meses de estocagem enquanto o iogurte tratado a 72°C/15s durou 3 meses e meio. A temperatura de estocagem foi ainda mais influente na qualidade sensorial das bebidas que a intensidade do tratamento térmico, sendo que os iogurtes estocados sob refrigeração não apresentavam nenhum indício de possível fim da vida útil após os 5 meses de análises.

5.1. Sugestão Para Novos Trabalhos

Os principais defeitos apontados pelos provadores, de uma maneira geral, foram alta acidez, baixa viscosidade e alteração do sabor.

O baixo Ph ajudou a manter tanto a estabilidade microbiológica quanto física, através da atuação ótima da pectina. Entretanto, do ponto de vista sensorial, os provadores apontaram sua preferência por bebidas de menor acidez. Dessa forma um estudo de elevação do Ph, visando obter um aumento na aceitação, até o limite máximo que não causasse alterações na estabilidade física e microbiológica do produto, seria interessante.

A preferência por produtos de viscosidade ligeiramente mais elevada também foi apontada pelos provadores. A pressão utilizada na homogeneização garantiu a

estabilidade física do produto através da diminuição do tamanho de partículas, mas reduziu muito a viscosidade. A redução da pressão de homogeneização, até um ponto em que se garanta aumento suficiente da viscosidade, sem alteração da estabilidade física das bebidas, poderia ser uma solução sem custo adicional ao produto final. Outra solução poderia ser a adição de sólidos (custo mais elevado) ou de espessantes que não interfiram no sabor das bebidas.

A alteração de sabor, porém, foi o fator limitante da vida-de-prateleira. Dessa forma, a principal sugestão para próximos estudos seria a aplicação de tratamentos térmicos mais brandos (termização) visando prolongar a aceitação do sabor do produto, até mesmo em temperatura ambiente, e ainda continuar garantindo estabilidade microbiológica, por se tratar de um produto ácido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AC NIELSEN. **Os produtos mais quentes do mundo:** informações sobre o crescimento de categorias de alimentos & bebidas em 2004. Jan. 2005. Disponível em: <http://www.acnielsen.com.br/publicacoes/alimentos_e_bebidas_2004.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2005.
- ANON. Aseptic take off. **Food Technology**, Chicago, Jan. 1971. p. 46-50.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 1997. Vol. II.
- ATHERTON, H. V.; NEWLANDER, J. A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4th ed. Westport AVI, US, 1981. 396p.
- BADRAN, I. I.; REICHART, O. Comparative study on some fermentation properties of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* in milk and modified milk media. **Acta Alimentaria**, v. 23, n. 2, p. 133-146, 1994.
- BIANCHI-SALVADORI, B. Lactic acid bacteria: biochemical characteristics affecting the texture of fermented milk products. In: IDF (International Dairy Federation). **Texture of Fermented Milk & Dairy Desserts**; Proceedings of the IDF Symposium, Vicenza (IT), 5-6 May 1997. Brussels, 1998. p. 48-62.
- BILLETDOUX, S. L. *Et al.* Evaluating the short-term impact of promoting the milk, yogurt and cheese group in efforts to increase dietary calcium consumption. **Abstracts**, v. 104, n. 8, Aug. 2004.
- BIROLLO, G. A.; REINHEIMER, J. A.; VINDEROLA, C. G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, v. 33, p. 799-805, 2000.
- BLAKE, M. R.; WEIMER, B. C. Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spores in food and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1643-1646, 1997.
- BODYFELT, F. W.; TOBIAS, J.; TROUT, G. M. **The Sensory Evaluation of Dairy Products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. 598p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2005. Seção 1, p. 7.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 nov. 2000. Seção 1, p. 9-12.

BROOKER, B. E. The behaviour of casein micelles in food processing. **Dairy Industries International**, London (GB), v. 52, n. 8, p. 17-20, 1987.

CANO-RUIZ, M. E.; RICHTER, R. L. Changes in physicochemical properties of retort-sterilized dairy beverages during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2116-2123, 1998

CASTRO A. G.; POUZADA, A. S. **Embalagens para a industria alimentar**. São Paulo: Instituto Piaget, 2003.

CHAMBERS, J.V.; NELSON, P.E. **Principles of aseptic processing and packaging**. 2ª ed. Washington, 1993. 257p.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255-275, 2003.

CHOPRA, A. K.; MATHUR, D. K. Purification and characterization of heat-stable proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 3202-3211, 1985.

COOK, A. J.; FRIDAY, J. E. Food mixture or ingredient sources for dietary calcium: shifts in food group contributions using four group protocols. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 11, p. 1513-1519, 2003.

DANISCO A/S. **Microestructure and rheological properties of yogurt**. Braband, Denmark, 2002. (Technical Paper TP 2017-1e)

DANISCO A/S. **Determination of Stability Index for GRINDSTED® Pectin AMD Products**. Braband, Denmark, [s.d.]. (Technical Memorandum TM 2032-3e)

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolissacharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768, 2001.

DUGGAN, E.; WAGHORNE, E. Long-term evaluation of production protocols for stirred yoghurts produced using two different cultures. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 1/2, 2003.

EVERETT, D. W.; McLEOD, R. E. Interactions of polyssacharide estabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yogurt. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1175-1183, 2005.

FAO/WHO. Codex Stan 243. Standard for fermented milks. **Codex Alimentarius**, 2003. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=400>. Acesso em: 07 fev. 2008.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. 478p.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SHUTERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 261-270, 1997.

GLAHN, P. E. Hydrocolloid stabilization of protein suspensions at low Ph. **Prog. Fd.Nutr. Sci.**, Great Britain, v. 6, p. 171-177, 1982.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. Volume 1. Boca Raton, Florida, EUA: CRC Press, 1982.

GOULAS, A. E.; RIGANAKOS, K. ^a; KONTOMINAS, M. G. Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial monolayer and multilayer semirigid plastics packaging materials. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 69, p. 411-417, 2004.

GRINDSTED at the forefront in new product development. **Food Trade Review**, Kent (GB), v. 61, p. 575-576, 1991.

HELFERICH, W.; WESTHOFF, D. **All About Yoghurt**, London: Prentice-Hall, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: D. B. Rebocho, 1985.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3275-3283, 1991.

KOSIKOWSKI, F. V. Yogurt. In: KOSIKOWSKI, F. V. (Ed.) **Cheese and Fermented Milk Foods**. 2nd ed., Michigan, US: Ann Arbor, 1977.

LAURENT, M. A.; BOULENGUER, P. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 445-454, 2003.

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. Structure and physical properties of yoghurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3153-3164, 2004.

LUCEY, J. A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, 2004.

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

LUCEY, J. A.; TAMEHAMA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. Stability of model acid milk beverage: effect of pectin, concentration, storage temperature and milk heat treatment. **Journal of Texture Studies**, v. 30, p. 305-318, 1999.

LUCEY J. A.; SINGH H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, Essex (GB), v. 30, n. 7, p. 529-542, 1998.

LUCEY J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH H. .Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- δ -lactone. Effects of heat treatment and gelation temperature. **Journal of Texture Studies**, Westport (US), v. 29, p. 413-426, 1998a.

LUCEY J. A., TAMEHANA N., SINGH H., MUNRO, P. A. A Comparision of the formaiton, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. **Food Research International**, Essex (GB), v. 31, n. 2, p. 147-155, 1998b.

MAARSE, H. **Volatile Compounds in Foods and Beverages**. New York: M. Dekker, 1991. 764p.

MAN, C. M. D.; JONES, A. A. **Shelf life evaluation of foods**. London: Chapman & Hall, 1996.

MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington, D.C.: APHA, 1993.

MERCOSUL. Resolução Mercosul nº 86, de 11 de outubro de 1996. Aprovar o Regulamento Técnico do Mercosul sobre Aditivos Alimentares a serem empregados segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que figura em Anexo e forma parte da presente Resolução. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento do Brasil**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=6497>>. Acesso em: 12 nov. 2005.

MILK NET. **Famílias brasileiras estão bebendo mais iogurte e água mineral**. 21 maio 2004a. Disponível em: <<http://www.milknet.com.br/noticias.php?id=631>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

MILK NET. **Iogurte é símbolo do que acontece com o consumo brasileiro**. 30 jun. 2004b. Disponível em: <<http://www.milknet.com.br/noticias.php?id=710>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

MILK NET. **Danubio entra no mercado de iogurtes**. 06 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.milknet.com.br/noticias.php?id=1577>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

MILK POINT. **Iogurte e leite desnatado estão na lista dos 10 alimentos mais importantes**. 25 jun. 2004a. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/mn/girolacteo/artigo.asp?nv=1&id_artigo=19267&area=31>. Acesso em: 10 nov. 2005.

MILK POINT. **Mudanças nos hábitos de consumo e crescimento do varejo impactam cadeia do leite**. 23 nov. 2004b. Disponível em:

<http://www.milkpoint.com.br/mn/girolacteo/artigo.asp?nv=1&id_artigo=21201&area=31>. Acesso em: 10 nov. 2005.

MILK POINT. **Saúde e conveniência direcionarão crescimento no setor de alimentos.** 02 fev. 2005. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/mn/marketingdoleite/artigo.asp?nv=1&id_artigo=21987&area=36>. Acesso em: 10 nov 2005.

PEREIRA, R. B.; SINGH, H.; MUNRO, P. A.; LUCKMAN, M. S. Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 655-667, 2003.

PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. **Handbook of Hydrocolloids**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 450p.

PETRUS, R.R.; Adaptação e avaliação de desempenho de sistema asséptico para leite fluido em garrafa plástica. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

REYES, J.; ALBANO, C.; DAVIDSON, E.; POLEO, R.; GONZÁLEZ, J.; ICHAZO, M.; CHIPARA, M. Effects of gamma irradiation on polypropylene, polypropylene + high density polyethylene and polypropylene + high density polyethylene + wood flour. **Mat Res Innovat**, v. 4, p. 294–300, 2001.

RICE, J. What's new in aseptics? **Food Processing**, v. 54, n. 10, p. 12-23, 1993.

ROBINSON, R.K. Product design. **Food Ingredients & Analysis International**, Hertfordshire (GB), v. 22, n. 2, p. 15-18, 2000.

SEDLMEYER, F.; BRACK, M.; RADEMACHER, B.; KULOZIK, U. Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 331-336, 2004.

SPEER, E. Acidified milk products. In: **Milk and dairy product technology**. Translated by Axel Mixa (Nordstedt, DE). New York: Marcel Dekker, 1998.

STABILISERS properties and uses. **Dairy Industry International**, London, v. 57, n. 11, p. 25-26, 1992.

STAFF, M. Cultured milk and fresh cheeses. In: EARLY, R. (Ed.). **The technology of dairy products**. 2nd ed. London, UK: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 123-157.

STOFFERS, N. H.; LINSEN, J. H.; FRANZ, R.; WELLE, F. Migration and sensory evaluation of irradiated polymers. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 203–206, 2004.

STONE, H.; SIDEL, J. L. Affective testing. In: **Sensory evaluation practices**. 2nd. Ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 243-270.

SZCZESNIAK, A. S. **Relationship of texture to food acceptance and nutrition.** In: J. Solms, D. A. Booth; R. M. Pangborn & J. Raunhard (Editors), Food Acceptance and Nutrition. London: Academic Press, 1974. p. 157-172.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: Science and Technology.** Boca Raton: CRC Press, 2000.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogur: Ciência y Tecnología.** Traduzido por Maria de la Concepción Díaz de Villegas Soláns y Álvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 368p.

TSUKAHARA, L. **Tamanho de partículas** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <marimacchione@yahoo.com.br> em 14 nov. 2005.

UK-DTF. **Code of practice for composition and labelling of yoghurt.** London, 1983. 5 p.

VALERO, E.; VILLAMIEL, M.; MIRALLES, B.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. **Food Chemistry**, v. 72, p. 51-58, 2001.

WALSTRA, P. **Dairy science and technology.** Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006. 782p.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n 8, 1965 – 1979 (1990).

WALTER, R. H. **The Chemistry and Technology of Pectin.** San Diego: Academic Press, 1991. 276p.

ANEXO I – Ficha de Análise Sensorial

Nome: _____ Data: ____/____/____

Você receberá 4 amostras de bebida láctea fermentada sabor morango. Por favor, avalie a **APARÊNCIA** de cada amostra e indique, de acordo com a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

	Nº Amostra	Aparência
9 gostei extremamente		
8 gostei muito		
7 gostei moderadamente	_____	_____
6 gostei ligeiramente	_____	_____
5 nem gostei/ nem desgostei	_____	_____
4 desgostei ligeiramente	_____	_____
3 desgostei moderadamente	_____	_____
2 desgostei muito	_____	_____
1 desgostei extremamente		

Comentários:

Prove a amostra e avalie seu **SABOR**, indicando, de acordo com a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou.

	Nº Amostra	Sabor
9 gostei extremamente		
8 gostei muito		
7 gostei moderadamente	_____	_____
6 gostei ligeiramente	_____	_____
5 nem gostei/ nem desgostei	_____	_____
4 desgostei ligeiramente	_____	_____
3 desgostei moderadamente	_____	_____
2 desgostei muito	_____	_____
1 desgostei extremamente		

Comentários:

Avalie a **VISCOSIDADE** da amostra em relação ao que você considera IDEAL, de acordo com a escala abaixo. Se a amostra estiver muito grossa, então a viscosidade será maior que a ideal. Se a amostra estiver muito líquida, então a viscosidade será menor que a ideal.

	Nº Amostra	Viscosidade
+3 muito mais viscoso que o ideal (muito grosso)		
+2 moderadamente mais viscoso que o ideal		
+1 ligeiramente mais viscoso que o ideal		
0 ideal		
-1 ligeiramente menos viscoso que o ideal		
-2 moderadamente menos viscoso que o ideal		
-3 muito menos viscoso que o ideal (muito líquido)		

Indique, de acordo com a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou da amostra, **DE UM MODO GERAL**.

	Nº Amostra	Impressão Global
9 gostei extremamente		
8 gostei muito		
7 gostei moderadamente		
6 gostei ligeiramente		
5 nem gostei/ nem desgostei		
4 desgostei ligeiramente		
3 desgostei moderadamente		
2 desgostei muito		
1 desgostei extremamente		

Comentários:

Você compraria as amostras? Assinale de acordo com a escala abaixo.

	Nº Amostra	Intenção de Compra
5 Certamente compraria		
4 Provavelmente compraria		
3 Tenho dúvidas se compraria ou não		
2 Provavelmente não compraria		
1 Certamente não compraria		

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS

PROJETO DE MESTRADO:

Qualidade e estabilidade de “iogurte líquido de vida estendida”: propriedades físico-químicas, microestrutura e aceitação sensorial

RSPONSÁVEL PELA PESQUISA: **Mariana Martins Macchione**

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: O iogurte produzido de acordo com o processo convencional pode ser estocado e transportado apenas sob refrigeração e por um tempo limitado. Os principais fatores que limitam a sua vida-de-prateleira são: a aceitação sensorial, devido à pós-acidificação, dessoragem e problemas na textura, além do crescimento de bolores e leveduras. Uma forma alternativa de preservação do iogurte é a utilização do calor, através da aplicação de um tratamento térmico após a fermentação, baseado no efeito letal do calor na faixa de pH ácido, sendo o produto resultante referido por “iogurte de vida estendida”. O tratamento térmico em pH baixo tem por finalidades: destruir o fermento láctico e enzimas para evitar a pós-acidificação, e destruir a flora contaminante, principalmente bolores e leveduras provenientes do ambiente. A qualidade do iogurte será avaliada periodicamente, através de análises físico-químicas, estruturais e microbiológicas.

PROCEDIMENTO: As amostras de iogurte serão submetidas a um teste de aceitação sensorial e intenção de compra, aplicado a 30 consumidores não-treinados.

O provador terá, durante a execução do projeto, toda a liberdade para questionamento de qualquer dúvida e esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como poderá deixar de participar a qualquer tempo, sem prejuízos. A equipe deixa claro ao provador que não haverá qualquer risco com a sua participação na pesquisa, a menos que o provador tenha alergia a algum dos ingredientes do iogurte, o que deverá ser informado previamente à equipe responsável pela pesquisa. Além disso, a equipe assegura que os dados de identidade fornecidos são sigilosos.

Membros da Equipe:

MARIANA MARTINS MACCHIONE
WALKIRIA HANADA VIOTTO

FONE: (19) 3788.4007
FONE: (19) 3788.3899

Comitê de Ética em Pesquisa em caso de reclamações: - (19) 3788-8936

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pela pesquisa: _____

Assinatura do provador: _____

RG: _____

ANEXO III - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/03/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 073/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0051.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "QUALIDADE E ESTABILIDADE DE IOGURTE LÍQUIDO DE VIDA ESTENDIDA: PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROESTRUTURA E ACEITAÇÃO SENSORIAL"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mariana Martins Macchione

INSTITUIÇÃO: Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA – UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/02/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/03/07 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a intensidade do tratamento térmico e da temperatura de estocagem na qualidade e vida útil do iogurte líquido de vida estendida. A avaliação periódica dos principais fatores que limitam a vida de prateleira, como acidez, sinérese, viscosidade aparente e qualidade microbiológica será realizada durante a estocagem. Testes de avaliação sensorial, com avaliação de aparência, viscosidade, sabor e impressão global, além de intenção de compra serão realizados para os diferentes produtos. O efeito do tratamento térmico na estrutura do gel será estudado através da microscopia eletrônica de varredura do produto.

III - SUMÁRIO

Trata-se de projeto de desenvolvimento de iogurte líquido de vida estendida, ou seja, produto com fabricação diferenciada, o que permitirá estocagem e transporte em temperatura ambiente, ao contrário dos iogurtes convencionais. A participação dos sujeitos de pesquisa consiste na avaliação das amostras da bebida láctea pasteurizada, após a fermentação e envasamento asséptico. O risco dos sujeitos é baixo, consistindo apenas de risco de alergias alimentares. Para que este risco seja minimizado, os pesquisadores selecionarão provadores habituados ao consumo de iogurte e/ou outras bebidas lácteas e que assinem o termo de consentimento livre e esclarecido, além de questionário sobre antecedentes alimentares. Além disto, os pesquisadores se comprometem a, durante os testes sensoriais, a responder a quaisquer questionamentos, dúvidas ou esclarecimentos solicitados pelo provador.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
ccp@fcm.unicamp.br

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto claro, sem oferecer riscos aos sujeitos de pesquisa, com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado à população alvo (provedores). Tem orçamento submetido à agência de fomento.

Recomendação: Rever apenas o item 6 do anexo 4.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de março de 2006.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br