



**ESTUDO DO ACETALDEÍDO, DIACETIL E  
ETANOL EM LEITES FERMENTADOS**

**SANDRA MARIA PINTO**

**2001**



**SANDRA MARIA PINTO**

**ESTUDO DO ACETALDEÍDO, DIACETIL E ETANOL  
EM LEITES FERMENTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof Dr Luiz Ronaldo de Abreu



LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Pinto, Sandra Maria

Estudo do acetaldeído, diacetil e etanol em leites fermentados / Sandra Maria  
Pinto. -- Lavras : UFLA, 2001.

87 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia:

1. Composto volátil. 2. Leite fermentado. 3. Iogurte. 4. Acetaldeído. 5. Diacetil.  
6. Etanol. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.1476

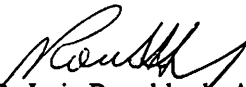
**SANDRA MARIA PINTO**

**ESTUDO DO ACETALDEÍDO, DIACETIL E ETANOL  
EM LEITES FERMENTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do  
Curso de Pós-graduação em Ciência dos  
Alimentos, para obtenção do título de  
“Doutor”.

APROVADA em 26 de setembro de 2001

**Profª Drª Eliana Pinheiro de Carvalho** - **UFLA**  
**Prof Dr Luiz Carlos de Oliveira Lima** - **UFLA**  
**Prof Dr Leorges Moraes da Fonseca** - **UFMG**  
**Profª Drª Ana Helena Romaniello Coelho** - **UFLA**

  
**Prof Dr Luiz Ronaldo de Abreu**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**

*A Deus,*

*por me iluminar e me dar forças para atingir esta meta;*

*Aos meus pais, Vicente e Santa,*

*por me darem a vida e sempre me apoiarem nas  
minhas decisões;*

*Ao meu grande amor Luiz Ronaldo,*

*por sempre estar presente me dando  
forças para caminhar...;*

*A minha sogra D<sup>a</sup> Nitinha por*

*sempre me apoiar e oferecer tanto  
carinho...*

## **OFEREÇO**

*Aos meus irmãos, Vicentinho, Yelanda, Dalva,*

*Maria Celeste e Andreia;*

*Aos meus cunhados, Luiz Marcelo, Amarildo, José Eduardo,*

*Agostinho, Maria Helena, Magna e Mônica,*

*Aos meus queridos sobrinhas, Fábio, André, Gustavo,*

*Marcelinho, Renan e Daniela;*

## **DEDICO**

*...recebendo este título, jamais poderei deixar de lembrar de meu avô Manuel Pinto, que infelizmente não se encontra mais entre nós, mas com certeza vou sempre lembrar dele quando alguém me chamar de "doutora", pois quando passei no vestibular ele com toda a sua simplicidade já me deu este título. Você, sei que estava longe mas era o meu primeiro passo. Este título é para o senhor...*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pelo incentivo, confiança e oportunidade para realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

À Wiesby e a Chr. Hansen, pela doação de ingredientes necessários à condução da pesquisa.

À EMBRAPA - Gado de Leite, pela ajuda em uma das fases do experimento.

Ao Departamento de Zootecnia – UFLA, pelo apoio e fornecimento do leite utilizado na elaboração dos iogurtes.

Ao Departamento de Biologia, em especial à Professora Geovana, pela disponibilidade em ceder o microscópio eletrônico para as fotografias.

Ao Professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela constante ajuda, valiosas contribuições, orientação, confiança e companheirismo ao longo do curso de doutorado e na vida.

Ao Professor Admilson Bosco Chitarra pelo apoio, disponibilidade e amizade, sua ajuda veio no momento em que mais estava precisando.

Ao Professor Luiz Carlos de Oliveira Lima pelo apoio, orientação, confiança, ensinamentos e por disponibilizar o laboratório de pós-colheita para realização de uma das etapas do experimento.

À Professora Eliana Pinheiro de Carvalho pela orientação e por tornar disponível o laboratório de Microbiologia para realização das análises microbiológicas.



Ao Professor Paulo Roberto Clemente, pela valiosa ajuda e disponibilidade na análise sensorial, ensinamentos e amizade.

À Professora Ana Helena Romaniello Coelho, pelas valiosas contribuições, disponibilidade e amizade.

À Professora Joelma Pereira, pela amizade, disponibilidade e ajuda na correção.

Aos demais professores do Departamento de Ciência dos Alimentos pelos ensinamentos e convivência.

Ao Professor Leorges Moraes da Fonseca -UFMG, pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Ao Professor Elias Tadeu Fialho, do departamento de Zootecnia, pela confiança e amizade.

Ao Dr. José Renaldi Feitosa Brito e sua esposa Dr<sup>a</sup> Cida (EMRAPA-Gado de Leite), pela acolhida e por proporcionar condições para as devidas correções desta tese e pelos gestos de amizade a mim dispensados.

À funcionária e amiga Creuza Pedroso do Amaral Rezende pela ajuda constante nas análises laboratoriais, apoio e amizade principalmente nos momentos mais difíceis, não medindo esforços para o bom andamento do experimento e ao seu marido Paulo, por estar sempre disponível para ajudar.

Aos funcionários Cidinha, Mércia, Sr. Miguel, Tina, Gicelda, Luciana, e Rosinha pela convivência, disponibilidade e ajuda.

Aos demais funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos pela amizade e convivência.

Ao funcionário Tião do Setor de Obras da UFLA, um agradecimento especial por estar sempre disponível, sem a sua preciosa ajuda, não seria possível realizar este experimento.

Aos amigos do curso de pós-graduação, Herbert, Alberto, Silvio Soglia, Gilson, Fernando Magalhães, Patrícia, Ivana, Celso, Daise, Leonora, Mônica,

Marluce, Gabi, Alexandre e Cristiane, pela convivência e apoio incondicional, e em especial ao amigo Rogerinho pela amizade, disponibilidade e boa vontade em sempre querer ajudar.

Aos julgadores, Sandra, Nísia, Joelma, Heloísa, Vaninha e Daniela, pela disponibilidade, responsabilidade e paciência durante as análises sensoriais.

As alunas de Iniciação Científica, Gracinha, Louisiane, Juliana e Camila, pela ajuda incondicional, com certeza aprendemos muito juntas.

Aos funcionários do Estábulo do Departamento de Zootecnia que colaboraram na coleta do leite.

Ao funcionário Carlos do Departamento de Zootecnia, pela valiosa ajuda nas correções da tese e por sempre poder contar com sua amizade.

Aos demais funcionários do departamento de Zootecnia pela disponibilidade e amizade.

Não podia deixar de lembrar meus dois amiguinhos Fred e Kate, sempre presentes em todos os momentos...

À todas aquelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!!!**

*... Cada pessoa que passa em nossa vida é única, sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós, há as que levaram muito, mas não há as que não deixaram nada...*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Produção de iogurte no Brasil.....	5
2.2 Importância nutricional e terapêutica do iogurte.....	7
2.3 Geração de compostos de importância para o “flavor”do iogurte.....	12
2.4 Ácidos graxos voláteis.....	24
2.5 Influência dos constituintes do leite no “flavor”do iogurte.....	24
2.5.1 Leite fresco....	24
2.5.2 Contaminação na fermentação.....	25
2.6 Características sensoriais.....	26
2.7 Determinação dos compostos voláteis através da cromatografia.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Fase I: Avaliação de iogurtes elaborados com culturas isoladas e mistas.....	32
3.2 Fase II: Avaliação de iogurtes elaborados com diferentes culturas comerciais.....	33
3.2.1 Fabricação dos iogurtes.....	34
3.2.1.1 Matéria-prima.....	36
3.2.1.2 Contagem de células somáticas.....	36
3.2.1.3 Tratamento térmico do leite.....	36
3.2.1.4 Inoculação.....	36
3.3 Fase III: Avaliação dos iogurtes naturais.....	36
3.3.1 Coleta de iogurte no mercado.....	37
3.4 Análises realizadas nas fases I, II e III.....	37

3.4.1 pH.....	37
3.4.2 Análises cromatográficas.....	37
3.4.2.1 Preparo da amostra.....	37
3.4.2.2 Injeção das amostras.....	38
3.4.2.3 Identificação dos picos.....	39
3.4.2.4 Quantificação dos picos.....	39
3.4.2.5 Desodorização do iogurte.....	40
3.4.2.5.1 Preparo das amostras padrão.....	40
3.4.2.5.2 Calibração do método.....	40
3.4.3 Relação de cocos e bacilos.....	40
3.5 Fase V: Análise sensorial (obtenção do limiar de detecção do diacetil).	41
3.5.1 Recrutamento dos julgadores.....	42
3.5.2 Seleção dos julgadores.....	42
3.5.3 Teste de ordenação com diacetil.....	44
3.5.4 Teste de limites de diacetil.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 pH.....	49
4.2 Acetaldeído.....	54
4.3 Diacetil.....	60
4.4 Etanol.....	65
4.5 Relação cocos/bacilos.....	69
4.6 Metodologia utilizada na extração, identificação e quantificação dos compostos voláteis através da cromatografia gasosa.....	74
4.7 Análise sensorial.....	75
4.7.1 Teste do limiar de detecção de diacetil.....	75
4.7.2 Teste do limiar de detecção de acetaldeído.....	78
5 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## RESUMO

PINTO, Sandra Maria. **Estudo do acetaldeído, diacetil e etanol em leites fermentados**. Lavras: UFLA, 2001. 87p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos).\*

Com o objetivo de avaliar a geração de acetaldeído, diacetil e etanol em iogurtes naturais (integral) elaborados com culturas comerciais e iogurtes de mercado, bem como o comportamento de culturas puras de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, em relação à geração destes compostos, utilizou-se a técnica de "headspace" na preparação das amostras e em seguida foi utilizada cromatografia gasosa para identificação e quantificação destes compostos. Também foi avaliada através da análise sensorial o limiar de detecção de diacetil, um dos principais compostos voláteis que contribui para o aroma do iogurte. Observou-se que tanto os iogurtes naturais disponíveis no comércio quanto os elaborados com culturas comerciais e culturas puras, mostraram concentrações de acetaldeído de 11 a 35 ppm e concentrações de diacetil variando de 0 a 0,85 ppm, aos 21 dias de armazenamento. Houve uma produção crescente de etanol durante todo o período de estocagem em todos os produtos, sendo verificado inclusive a produção deste composto durante o período de incubação nos iogurtes analisados nesta fase. Observou-se ainda que quanto menor a concentração de acetaldeído, maior a produção de etanol em algumas marcas de iogurtes. Apesar das culturas comerciais serem consideradas mistas, em todos os iogurtes analisados, inclusive os de mercado, foi observado um desbalanceamento acentuado das culturas lácticas, predominando os estreptococos em relação aos lactobacilos. O limiar de detecção encontrado (0,0039 ppm) foi abaixo do encontrado na literatura, devido provavelmente à diluição do produto, que foi feita na forma pura em água destilada deionizada, na qual não havia nenhum composto que pudesse mascarar o seu real aroma. As técnicas de captura de "headspace", identificação e quantificação através da cromatografia gasosa utilizadas neste experimento se mostraram adequadas na identificação e quantificação dos principais compostos aromáticos e do etanol presentes no iogurte.

---

\* Comitê Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Orientador), Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA, Luiz Carlos de Oliveira Lima - UFLA, Leorges Moraes da Fonseca - UFMG, Ana Helena Romaniello Coelho - UFLA.

## ABSTRACT

PINTO, Sandra Maria. Study of acetaldehyde, diacetyl and ethanol in fermented milk. Lavras: MG, 2001. 87p. (Thesis – Doctorate in Food Science)\*

With the objective of evaluating the production of acetaldehyde, diacetyl and ethanol, whole plain yogurts elaborated with commercial starter, yogurt acquired in the local market as well as fermented milk with either *S.salivarius* subesp. *thermophilus* or *Lactobacillus bulgaricus* were evaluated, in relation to the generation of such compounds. It was utilized the headspace technique for sample preparation, followed by identification and quantification by gas chromatography. The odor threshold of diacetyl, one of the most important compounds contributing to flavor in yogurt, was determined by sensorial analysis. It was observed that plain yogurt acquired in the market, those elaborated with commercial starters, and the products elaborated with single cultures, presented, after 21 days of storage, concentrations of acetaldehyde and diacetyl of respectively, 11 to 35 ppm and 0 to 0,85 ppm. An increasing production of ethanol was observed during the whole storage period. For all products, the production of this compound was observed even in the incubation stage. It was also observed that lower acetaldehyde concentration had high correlation to ethanol production, in some products. The commercial starter, supposed to be composed by two microorganisms, presented a remarkable disbalance, with high prevalence of streptococcus compared to lactobacillus. The odor threshold detected (0,0039 ppm) was lower than those reported in literature, may be in function of the utilization, in this work, of pure compound, diluted in de-ionized distilled water, in which there was no other substance that usually interfere with the odor and aroma of the analyzed compound. The capture of headspace, identification and quantification techniques by gas chromatograph utilized in this work, were efficient to identify and quantify of the major aromatic compounds and ethanol contents of yogurt.

---

\* Guidance Committee: Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Major Professor), Eliana de Carvalho Pinheiro - UFLA, Luiz Carlos de Oliveira Lima - UFLA, Leorges Moraes da Fonseca - UFMG, Ana Helena Romaniello Coelho - UFLA.

*Lactobacillus bulgaricus* suporta uma acidez superior, sendo possível que ao menos uma parte destas bactérias alcancem o intestino e permaneçam viáveis.

Há aproximadamente umas três décadas, o interesse pelo iogurte na maioria dos países ocidentais limitava-se a um produto fermentado, vendido principalmente em lojas de produtos dietéticos. A produção era escassa, as técnicas de elaboração elementares e em muitos casos, os produtos obtidos tinham características e qualidades muito variáveis. O aumento da demanda de iogurte de frutas e de outros novos tipos tem conduzido a uma notável difusão dos processos básicos. /Atualmente, os pesquisadores e as indústrias de laticínios buscam conhecimentos mais amplos dos efeitos dos distintos processos biológicos e dos diversos mecanismos sobre a eficácia dos sistemas de produção do iogurte e sobre sua qualidade e características nutritivas /O iogurte como descrito por Ferreira (1993), é um produto lácteo, ácido, que envolve o uso de culturas simbióticas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Embora existam, até hoje, controvérsias sobre uma definição exata de iogurte em termos de sua composição química e tipos de organismos, ele é definido como o produto que resulta da fermentação do leite por culturas “starters” que contenham somente o *Lactobacillus bulgaricus* e o *Streptococcus thermophilus*. No entanto, não há impedimento para que o produto possa ser veículo de outras bactérias, sendo as mais utilizadas o *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e as *bifidobactérias* (Tamine e Robinson, 1991).

Em 1989, foi descentralizado o sistema de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, permitindo aos estados a fiscalização de produtos que não ultrapassam as suas fronteiras e, aos municípios, a dos produtos locais. Com isso, a produção de iogurte por pequenas fábricas experimentou um aumento muito grande, sendo então difícil precisar o volume de sua produção (SEBRAE/FAEMG, 1996).

## ABSTRACT

PINTO, Sandra Maria. Study of acetaldehyde, diacetyl and ethanol in fermented milk. Lavras: MG, 2001. 87p. (Thesis – Doctorate in Food Science)\*

With the objective of evaluating the production of acetaldehyde, diacetyl and ethanol, whole plain yogurts elaborated with commercial starter, yogurt acquired in the local market as well as fermented milk with either *S.salivarius* subesp. *thermophilus* or *Lactobacillus bulgaricus* were evaluated, in relation to the generation of such compounds. It was utilized the headspace technique for sample preparation, followed by identification and quantification by gas chromatography. The odor threshold of diacetyl, one of the most important compounds contributing to flavor in yogurt, was determined by sensorial analysis. It was observed that plain yogurt acquired in the market, those elaborated with commercial starters, and the products elaborated with single cultures, presented, after 21 days of storage, concentrations of acetaldehyde and diacetyl of respectively, 11 to 35 ppm and 0 to 0,85 ppm. An increasing production of ethanol was observed during the whole storage period. For all products, the production of this compound was observed even in the incubation stage. It was also observed that lower acetaldehyde concentration had high correlation to ethanol production, in some products. The commercial starter, supposed to be composed by two microorganisms, presented a remarkable disbalance, with high prevalence of streptococcus compared to lactobacillus. The odor threshold detected (0,0039 ppm) was lower than those reported in literature, may be in function of the utilization, in this work, of pure compound, diluted in de-ionized distilled water, in which there was no other substance that usually interfere with the odor and aroma of the analyzed compound. The capture of headspace, identification and quantification techniques by gas chromatograph utilized in this work, were efficient to identify and quantify of the major aromatic compounds and ethanol contents of yogurt.

---

\* Guidance Committee: Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Major Professor), Eliana de Carvalho Pinheiro - UFLA, Luiz Carlos de Oliveira Lima - UFLA, Leorges Moraes da Fonseca - UFMG, Ana Helena Romaniello Coelho - UFLA.



## 1 INTRODUÇÃO

/O iogurte é um derivado do leite conhecido pelo homem há cerca de 4.000 anos, tendo sido desenvolvido nas estepes da Ásia e nos países do Mediterrâneo, particularmente nos Balcãs (Bulgária, Turquia, Sérvia, Grécia, Romênia). Uma lenda conta que o iogurte foi descoberto, quando um pastor transportando o leite em um odre (vasilhame de couro) observou que o mesmo havia coagulado. Como, por algum motivo, não tinha outro alimento, teve que se contentar com aquele material denso, espesso e ácido. A contínua migração de populações das estepes da Europa oriental levou esse alimento dos Balcãs ao Mediterrâneo. Com as expedições bélicas dos Fenícios, Egípcios, Gregos e Romanos, foi possível a difusão do iogurte na parte ocidental da Europa. A evolução deste produto fermentado ao longo dos anos pode-se atribuir às habilidades culinárias dos povos nômades desta parte do mundo, e o interesse nele fez com que se espalhasse nos países europeus, como Itália, França e Holanda, e para a América do Norte. Nos países ocidentais, basicamente o seu consumo era devido a prescrições médicas em razão da reputação do seu valor terapêutico. Hoje, além de não ter perdido a característica dietética, é consumido no mundo inteiro como sobremesa, complemento de refeições ligeiras e mesmo por prazer, devido não só à sua apresentação, ao seu sabor e aspecto agradáveis, como também devido ao conhecimento do seu valor nutritivo. O efeito benéfico do iogurte é reforçado pela capacidade do *Lactobacillus bulgaricus* de implantar-se no intestino e modificar a microbiota dominante, assegurando a ausência de microrganismos putrefativos e patogênicos, motivo pelo qual se atribui uma maior vitalidade aos consumidores de iogurte (Deeth e Tamine, 1981). É bem conhecido que o *Streptococcus thermophilus* não tolera bem a acidez, sendo então, pouco provável que esta espécie resista à passagem pelo estômago. Sem dúvida, o

*Lactobacillus bulgaricus* suporta uma acidez superior, sendo possível que ao menos uma parte destas bactérias alcancem o intestino e permaneçam viáveis.

Há aproximadamente umas três décadas, o interesse pelo iogurte na maioria dos países ocidentais limitava-se a um produto fermentado, vendido principalmente em lojas de produtos dietéticos. A produção era escassa, as técnicas de elaboração elementares e em muitos casos, os produtos obtidos tinham características e qualidades muito variáveis. O aumento da demanda de iogurte de frutas e de outros novos tipos tem conduzido a uma notável difusão dos processos básicos. /Atualmente, os pesquisadores e as indústrias de laticínios buscam conhecimentos mais amplos dos efeitos dos distintos processos biológicos e dos diversos mecanismos sobre a eficácia dos sistemas de produção do iogurte e sobre sua qualidade e características nutritivas /O iogurte como descrito por Ferreira (1993), é um produto lácteo, ácido, que envolve o uso de culturas simbióticas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Embora existam, até hoje, controvérsias sobre uma definição exata de iogurte em termos de sua composição química e tipos de organismos, ele é definido como o produto que resulta da fermentação do leite por culturas “starters” que contenham somente o *Lactobacillus bulgaricus* e o *Streptococcus thermophilus*. No entanto, não há impedimento para que o produto possa ser veículo de outras bactérias, sendo as mais utilizadas o *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e as *bifidobactérias* (Tamine e Robinson, 1991).

Em 1989, foi descentralizado o sistema de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, permitindo aos estados a fiscalização de produtos que não ultrapassam as suas fronteiras e, aos municípios, a dos produtos locais. Com isso, a produção de iogurte por pequenas fábricas experimentou um aumento muito grande, sendo então difícil precisar o volume de sua produção (SEBRAE/FAEMG, 1996).

O aparecimento do “flavor” característico do iogurte se dá durante o crescimento associativo das bactérias, quando se observa uma produção rápida de acidez. Entre os principais componentes do “flavor” destacam-se o ácido láctico, o acetaldeído e o diacetil. O acetaldeído é considerado o composto típico no “flavor” do iogurte. O *Lactobacillus bulgaricus* é tido como sendo o principal responsável pela produção deste composto carbonilo. Segundo o relato de alguns autores (Harper e Hall, 1976; Ferreira, 1993), a proporção do acetaldeído é maior quando o *Lactobacillus bulgaricus* cresce junto com o *Streptococcus thermophilus*, o mesmo acontecendo com a produção de acidez.

Embora exista grande quantidade de relatos referentes à produção dos compostos aromáticos associados ao iogurte, muitos pontos ainda permanecem obscuros, o que leva à necessidade de estudos para elucidar a real contribuição dos microrganismos envolvidos na fermentação, bem como dos processos tecnológicos utilizados para a obtenção do iogurte, na geração desses compostos. Face a isso, este trabalho tem como objetivos:

#### **Objetivo Geral:**

Estudar a geração dos principais compostos voláteis (acetaldeído e diacetil) em iogurte, bem como a produção do etanol durante o período de comercialização.

#### **Objetivos específicos:**

- avaliar marcas de iogurtes comercializadas na região de Lavras - MG em relação às concentrações dos principais compostos voláteis (acetaldeído e diacetil);
- testar diferentes tipos de culturas “starters”, comercializadas no Brasil, referente à geração de compostos aromáticos;

- estudar em culturas isoladas a atividade do *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*; no processo de geração de compostos aromáticos e etanol;
- conhecer o limiar de detecção do diacetil;
- verificar a relação de cocos/bacilos existentes nos iogurtes encontrados no mercado varejista e elaborados com culturas comerciais.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

A manufatura dos produtos derivados do leite constitui um ramo altamente desenvolvido do setor industrial. Com o auxílio de pesquisas científicas, a industrialização do leite desenvolveu-se muito, tornando possível preservar e, em muitos casos, aumentar o seu valor nutritivo por períodos mais longos.

Desde épocas remotas, o iogurte, dentre os produtos derivados do leite, é o que tem experimentado maior aumento de produção. Diversos fatores podem justificar esse fato. Davis (1967) atribui esse aumento à observação da boa saúde e longevidade dos habitantes dos Balcãs que tinham o hábito de consumir leite fermentado, conhecido como “Yahourth”. Mocquot e Hurel (1970) mostraram que o sucesso se devia às qualidades organolépticas do leite fermentado. Já Tramer (1973) assegurou que o aumento do consumo se devia ao aparecimento do iogurte com polpa de frutas e às embalagens atrativas.

### **2.1 Produção de iogurte no Brasil**

No Brasil, o consumo de iogurte tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Segundo dados obtidos pelo SEBRAE/FAEMG (1996), alguns produtos lácteos tiveram desempenhos excepcionais em 1995, em relação ao ano de 1994, considerando-se somente os estabelecimentos sob inspeção federal. Isto mostra que o desempenho das bebidas lácteas teve um destaque especial, cuja produção em 1995 aumentou em 206% em relação a 1994, sendo que o iogurte teve um aumento de 47%. Esses números refletem uma mudança significativa nos hábitos dos consumidores, que, após a estabilização econômica, passaram a consumir produtos anteriormente restritos somente às classes mais altas, e no caso das bebidas lácteas e iogurtes, o desempenho excepcional da produção em 1995 é reflexo também da intensa

atuação das grandes e pequenas empresas no setor, sendo que as grandes empresas investiram fortemente em marketing e lançamentos de novos produtos, incentivando o consumo, principalmente pelas classes média e alta. Por outro lado, os pequenos laticínios passaram a produzir iogurte, utilizando embalagens e aromas mais baratos, o que contribuiu para tornar o produto acessível para as classes mais baixas da população.

Hoje, dados exatos da produção nacional de iogurte são difíceis de precisar, pois a maioria destes pequenos laticínios não possui registros, o que dificulta uma pesquisa sobre a produção. Todavia, observa-se na prática um aumento enorme do produto no mercado.

A relação abaixo mostra a produção de iogurte no Brasil, de 1991 até 2000, restringindo-se aos estabelecimentos sob Inspeção Federal (Quadro 1).

**QUADRO 1. Produção nacional de iogurte em estabelecimentos sob inspeção federal (em toneladas).**

<b>ANO</b>	<b>PRODUÇÃO</b>	<b>AUMENTO</b>
1991	112.401	
1992	115.912	3,12%
1993	76.364	-34,12%
1994	<b>80.182</b>	<b>5%</b>
1995	<b>117.647</b>	<b>47%</b>
1996	<b>222.920</b>	<b>90%</b>
1997	242.231	8,6%
1998	266.999	10,22%
1999	260.000	-2,62%
2000	270.040	3,8%

Fonte: Jank e Galan (2001)

## 2.2 Importância nutricional e terapêutica do iogurte

O Clube Internacional de Fabricantes de Iogurte tem adotado por unanimidade a seguinte definição:

“O iogurte é um leite fermentado, obtido por multiplicação no leite de bactérias específicas associadas, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Estas bactérias se cultivam no leite previamente aquecido, com a finalidade de eliminar total ou parcialmente a microbiota pré-existente. Após a fermentação, esfria-se o iogurte a uma temperatura compreendida entre 1 e 10°C, excluindo-se qualquer outro tratamento térmico, estando pronto para ser consumido” (Ferreira, 1993).

/De acordo com Varnam e Sutherland (1994), o iogurte é considerado como um alimento de alto valor nutritivo, rico em proteínas de boa qualidade, riboflavina, cálcio, fósforo e potássio, possuindo ainda um valor terapêutico que se atribui à presença de lactobacilos/Salado (1990), lembra que logo após o nascimento, o trato digestivo é colonizado por uma grande variedade de microrganismos, sendo que as bactérias predominantes na microbiota intestinal de animais jovens são os lactobacilos. Um grande número de fatores influencia a permanência destes microrganismos no trato intestinal, visto que à medida que o animal cresce, sua alimentação se modifica e os lactobacilos desaparecem, dando lugar às enterobactérias. Os lactobacilos são microrganismos resistentes à acidez. Diversos trabalhos mostraram a sobrevivência destes no trato intestinal, após várias semanas de ingestão de iogurte. Drasar, Shiner e Macleod (1969), em estudos feitos com pacientes, demonstraram que a barreira gástrica influencia a passagem das bactérias ingeridas para o intestino, mas os lactobacilos foram encontrados nas fezes em 91% dos casos, demonstrando uma alta taxa de passagem. Embora a acidez gástrica diminua a viabilidade de muitos microrganismos, os lactobacilos sobrevivem por muito tempo. Resultados obtidos por Salado (1990) mostraram

que a suplementação de dietas humanas com lactobacilos, exerceu efeitos benéficos sobre a microbiota intestinal, mantendo seu equilíbrio. O uso de lactobacilos, além de estabilizar e exercer um efeito protetor sobre a microbiota intestinal pode inibir a proliferação de bactérias patogênicas. O autor observou ainda que o consumo de iogurte resultou em significativo aumento no número de lactobacilos nas fezes dos indivíduos durante o período experimental, mostrando porém, que houve um declínio neste número após cessar o consumo de iogurte. Isto indicou a pouca habilidade desta bactéria em colonizar, por longo período de tempo, o trato intestinal de humanos. Uma observação importante é que os efeitos benéficos dos lactobacilos sobre a microbiota intestinal poderão ser prolongados se o iogurte ou outro produto que os contenha, for acrescentado na alimentação diária.

Tamine e Robinson (1991) sustentaram a hipótese de que uma das causas do envelhecimento humano se dá pela absorção intestinal e a passagem para a corrente sanguínea de determinados compostos nocivos resultantes da ação das bactérias putrefativas na porção terminal do íleo e do cólon. No entanto, ao suprimir-se a ação destas bactérias, poder-se-ia evitar as manifestações dos efeitos adversos dos produtos de seu metabolismo, o que levaria as pessoas a terem uma vida mais longa e mais saudável. Essa hipótese é razoável, explicando a inibição da ação destas bactérias pelo iogurte pelas seguintes razões:

- as bactérias acidófilas do iogurte resistem a pH baixos, enquanto que a maioria das bactérias nocivas apresentam ótimo crescimento e atividade metabólica a valores de pH próximos à neutralidade. Portanto à medida que a microbiota oriunda do iogurte passa pelo intestino, o ácido lático destrói a microbiota indesejável;
- o efeito do iogurte é reforçado pela capacidade de *Lactobacillus bulgaricus* de implantar-se no intestino e modificar a microbiota dominante, assegurando a



ausência ou diminuição do número de microrganismos putrefativos, motivo pelo qual se atribui uma maior vitalidade aos consumidores de iogurte.

Estas idéias têm sido alvo de profundos estudos e discussão, e tem-se um interesse notável na confirmação objetiva destas qualidades do iogurte.

É bem conhecido que o *Streptococcus thermophilus* não tolera bem a acidez, sendo então, pouco provável que esta espécie resista à passagem através do estômago. Sem dúvida, o *Lactobacillus bulgaricus* suporta um pH inferior, sendo possível que ao menos uma parte destas bactérias alcancem o intestino e permaneçam viáveis. Fica difícil a confirmação da hipótese de que o consumo habitual do iogurte possa determinar uma modificação da microbiota intestinal humana. Porém, nenhum trabalho, até o momento, tem demonstrado o contrário. Todavia, é importante salientar que o iogurte natural consumido pelos membros das tribos das zonas montanhosas da Europa oriental era um pouco diferente dos iogurtes que se encontram hoje no mercado. A microbiota daquele produto era extremamente variável, diferente do iogurte natural que se fabrica atualmente, quase que exclusivamente por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. O iogurte tradicional, que deu origem aos atuais iogurtes, continha provavelmente uma mescla de várias espécies de bactérias lácticas, podendo-se citar: *L. acidophilus*, *L. jugurtti*, *L. helveticus* e *Bifidobacterium bifidum*, sendo de especial interesse a associação de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, pois sabe-se que ambos os microrganismos são capazes de fixar-se no trato intestinal humano, possibilitando assim a competição com bactérias putrefativas (Tamine e Robinson, 1991).

Para Varnam e Sutherland (1994), o grande aumento da popularidade dos leites fermentados, especialmente do iogurte, deve-se, em princípio, ao interesse despertado, principalmente pelas suas supostas propriedades em prolongar a vida. Entretanto, o desenvolvimento nos últimos 50 anos dos

iogurtes com frutas e aromatizantes tem sido um fator importante para o aumento da procura pelo produto.

Embora o conteúdo de vitaminas no iogurte seja inferior ao do leite fresco integral, devido ao rigoroso tratamento térmico utilizado na sua fabricação, o conteúdo de proteína e cálcio são aumentados quando se adicionam sólidos não gordurosos na formulação (Deeth e Tamine, 1981).

Além da importância nutricional do iogurte e dos benefícios para a saúde tais como efeito antibiótico, redução da incidência de intolerância à lactose e doenças do trato gastrointestinal (Laye, Karleskind e Morr, 1993), esse produto lácteo possui propriedades organolépticas, como sabor e aroma agradáveis que incentivam o consumo, principalmente pelas crianças. Gonzalez et al. (1994) afirmaram que crianças consomem iogurte pelo seu “flavor”, mais do que por qualquer outro fator. Um outro aspecto que tem aumentado o consumo desse alimento, principalmente pelas crianças, é a boa aceitação que estão tendo os novos produtos como iogurte congelado duro, iogurte semi-congelado (“soft-serve”), iogurte fluido e outras variedades que podem ser fabricadas em escala industrial (Ott et al., 2000). Devido a uma hidrólise parcial durante a elaboração do iogurte e, principalmente, devido à permanência da lactase, alguns pesquisadores (Gallagher, Molleson e Caldwell, 1975; Kilara e Shahani, 1976) têm recomendado o iogurte como um meio alternativo de se obter os nutrientes do leite sem expor-se aos problemas de intolerância à lactose; em geral, a concentração final de lactose fica em torno de 4,3 a 7,8% (Brandão, 1980). Todavia somente 10 a 20% do conteúdo desta lactose é metabolizado em indivíduos intolerantes à lactose (Rand, 1976).

Kroger (1978) assinalou que o iogurte é um importante substituto para aquelas pessoas que não podem ingerir o leite por não tolerarem a lactose. Kelly (1984) explica que a intolerância à lactose é uma condição na qual o açúcar do leite não é hidrolizado em seus dois monossacarídeos componentes,

a glicose e a galactose. A enzima lactase é a responsável por esta catalização e, como os indivíduos com intolerância à lactose são deficientes desta enzima, o açúcar do leite passa pelo intestino sem sofrer transformação alguma, provocando diarreia e rompendo o equilíbrio osmótico existente no intestino. Parte dessa lactose é fermentada pela microbiota natural do intestino, formando gás, com consequente compressão e inchamento do ventre. No iogurte, parte da lactose já foi hidrolizada pelas bactérias lácticas e, segundo alguns autores, essa redução varia de 20 a 50% (Speck, 1983; Deeth e Tamine, 1981)

Para Ott, Fay e Chaintreau (1997), o consumo de iogurte vem aumentando de forma intensa desde os anos 60, devido principalmente, ao seu delicado aroma e sabor, associados com uma textura particular. Não menos importante são os benefícios nutricionais advindos do consumo de bactérias lácticas viáveis e dos seus produtos metabólicos.

Rasié e Kurmann (1978) atentaram para o fato de que muitos alimentos processados possuem um alto valor nutritivo, porém possuem sabor e aroma desagradáveis e não são bem aceitos. O iogurte, além de possuir um “flavor” agradável, possui ainda um alto valor nutritivo e uma consistência homogênea, aliada a uma moderada viscosidade, existindo ainda, iogurte com frutas e com baixo teor de gordura, o que o torna um produto versátil, sendo utilizado de forma eficiente em vários tipos de dietas.

Hoje, o iogurte além de não ter perdido a característica dietética, é consumido como sobremesa, como complemento de refeições ligeiras e mesmo por prazer, devido não só à sua apresentação, ao seu sabor e aspecto agradáveis, como também devido ao conhecimento de seu valor nutritivo (Ferreira, 1993).

Vale lembrar ainda, a importância do iogurte em dietas de emagrecimento. Geralmente, o iogurte natural desnatado é recomendado que seja incluído nas refeições, como auxílio na perda de peso, por aumentar a

digestão dos alimentos e também pela sua qualidade nutricional, pois uma dieta reduzida de calorias requer alimentos altamente nutritivos.

### **2.3 Geração de compostos de importância para o “flavor” do iogurte**

Os processos de decomposição da matéria orgânica normalmente resultam em substâncias com textura e “flavor” desagradáveis, além de nocivas à saúde. Porém as modificações causadas pelos microrganismos utilizados em fermentação de alimentos são benéficas, geralmente melhorando o “flavor”, a textura e, muitas vezes, acumulando vitaminas, além dos ácidos orgânicos que vão aumentar a vida de prateleira desses produtos. Isso é devido à atuação parcial destes microrganismos sobre um ou mais compostos básicos dos alimentos: hidratos de carbono, proteínas e gorduras. Os microrganismos fermentadores nunca atuam de maneira total sobre estes compostos. Assim, são incapazes de realizar de forma completa o processo oxidativo, gerando dessa forma compostos intermediários, muitos dos quais contribuem para o aroma e sabor (“flavor”) e as características reológicas do substrato, além de terem efeito preservativo, impedindo o desenvolvimento de outros microrganismos, evitando assim o processo deteriorativo (Tamine e Robinson, 1991).

O aroma característico do iogurte natural deve-se a metabólitos produzidos pelas culturas “starter”. Forma-se um grande número de compostos que podem contribuir para o “flavor”. Porém, entre eles os mais importantes são o ácido láctico e os compostos carbonílicos: acetaldeído e diacetil (Varnam e Sutherland, 1994). O ácido láctico é o principal componente do aroma e sabor de todos os leites fermentados. A quantidade em que se encontra presente determina a aceitabilidade do produto, sendo que sua presença em excesso altera negativamente o aroma e o sabor.

A importância relativa do acetaldeído e do diacetil varia em função da cultura “starter” utilizada. No caso do iogurte e de produtos similares, o

acetaldeído é o componente dominante, detectável no aroma e sabor quando o pH do iogurte abaixa para valores menores que 5,0, o que normalmente acontece. Os níveis máximos se produzem quando o pH é de 4,2 e o composto se estabiliza a um pH de aproximadamente 4,0. Numa revisão sobre os principais compostos voláteis responsáveis pelo “flavor” do iogurte, Badings e Netter (1980) mostraram que o acetaldeído fornece uma poderosa contribuição ao “flavor” do iogurte quando esse é elaborado de forma apropriada.

Segundo Rasié e Kurmann (1978) e Ferreira (1993), o acetaldeído, produto do metabolismo dos microrganismos envolvidos na fabricação de produtos lácteos fermentados, é reconhecido como um dos principais componentes do flavor, sendo que os microrganismos que formam quantidades variadas de acetaldeído e etanol durante seu crescimento contêm enzimas que catalisam a sua formação a partir de carboidratos, proteínas ou de alguns precursores de ácidos nucleicos. Culturas termófilas utilizadas como “starters” em leites fermentados são responsáveis pela síntese dos componentes de “flavor”, sendo os mais importantes, o diacetil e o acetaldeído (Monnet, Schmitt e Divies, 1994). Dentre as bactérias lácticas que produzem o acetaldeído estão o grupo N *Streptococci*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacilli* de modo geral (*Lactobacillus casei*, *L.delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*), *Leuconostoc* e bactérias propiônicas. O acetaldeído é produzido durante a manufatura do iogurte numa escala maior do que os outros compostos voláteis. A taxa de produção de acetaldeído é altamente dependente do nível de acidificação. A formação começa a um pH igual a 5, aumentando rapidamente em um valor de pH entre 4,4 e 4,3 (cerca de 3 horas a 42°C). Após isso, há um pequeno aumento e estabilização num pH de aproximadamente 4,0 (Bottazzi, Battistotti e Vescovo, 1971).

De acordo com alguns autores citados por Rasié e Kurman (1978), a diminuição do conteúdo de acetaldeído ocorre durante a estocagem do iogurte,

começando 5 horas após a elaboração. O conteúdo de acetaldeído também diminui em níveis de acidificação em torno de 115,75 °D. Outros pesquisadores também citados por Rasié e Kurman (1978) afirmaram, ao contrário, não existir nenhuma alteração no conteúdo de acetaldeído durante a estocagem do iogurte nos primeiros cinco dias. Hamdam, Kunsman e Deane (1971) utilizando três amostras de iogurtes fabricados com diferentes culturas, mostraram um decréscimo do conteúdo de acetaldeído durante a estocagem por duas semanas, em duas das amostras, ficando uma amostra inalterada.

A principal produção de acetaldeído é atribuída ao *Lactobacillus bulgaricus*. Porém várias linhagens desta espécie mostraram diferenças consideráveis nessa produção. Quando em associação de *Streptococcus thermophilus* com *Lactobacillus bulgaricus*, a taxa de produção de acetaldeído é consideravelmente aumentada quando comparada com *Lactobacillus bulgaricus* isoladamente (Bottazzi, Battistotti e Vescovo, 1971). A relação simbiótica entre estas espécies, influencia favoravelmente a produção desse importante composto aromático durante a elaboração de iogurte.

O *Streptococcus thermophilus* produz uma pequena quantidade de acetaldeído, que é considerada sem importância para o “flavor” (Groux, 1973). Muitas espécies de *Lactococcus lactis* também produzem acetaldeído numa taxa entre 0,5 e 10 ppm. Porém, o aumento da produção de acetaldeído dessas culturas é indesejável na fabricação de culturas de leite e culturas de creme, porque causam o assim chamado defeito de “flavor” do iogurte nestes produtos. Isto é usualmente evitado com a substituição do *Lactococcus lactis* subesp *diacetylactis* pelo *Leuconostoc*, sendo que este último não tem capacidade de produzir acetaldeído.

A degradação da lactose é considerada como sendo uma fonte primária de produção de acetaldeído em iogurte (Figura 1). Sob certas circunstâncias, a

transformação de aminoácidos como a valina, pode ser uma possível fonte (Rasié e Kurmann, 1978).

A quantidade de acetaldeído que se produz é aumentada quando se eleva os sólidos do leite e além disso, os tratamentos térmicos do leite têm estimulado o crescimento de culturas “starters”. Nos iogurtes elaborados com leites das diferentes espécies, os níveis de acetaldeído são distintos, os mais altos estão nos iogurtes elaborados com leite de vaca e os mais baixos nos iogurtes elaborados com leite de ovelha (Badings e Netter, 1980). Durante o armazenamento há perdas de acetaldeído, especialmente se o produto contiver pouca quantidade de gordura, a qual tem a propriedade de reter esse composto.

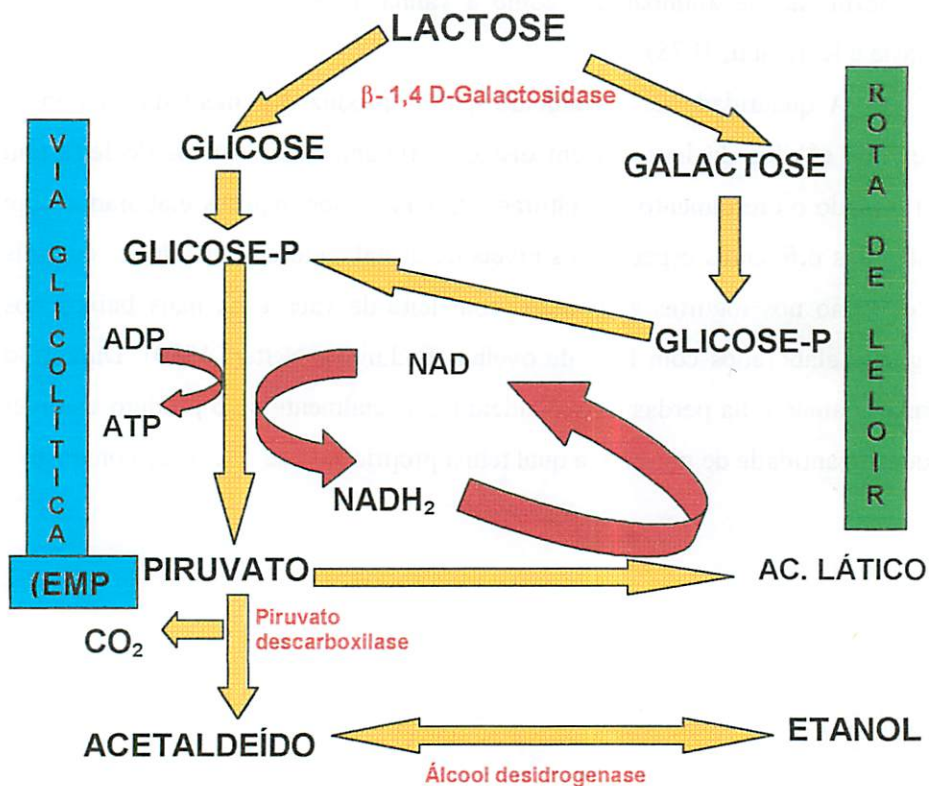


FIGURA 1 Metabolismo do acetaldeído, ácido láctico e etanol a partir da fermentação da lactose.

Stien et al. (1999) e trabalhos como o de Amoores e Hautala (1983) estimaram que o limiar de detecção para o acetaldeído varia de 0,01 a 0,07 ppm. Na literatura existem numerosos trabalhos que citam o limiar de detecção para o acetaldeído (Ulberth e Kneifel, 1992; Ott et al., 2000), porém nenhum deles deixa claro como os valores foram obtidos. Nota-se uma preocupação



com os efeitos do acetaldeído sobre a saúde humana, sendo que concentrações bem pequenas (0,005 ppm), próximas do limiar ou mesmo abaixo deste valor, podem causar efeitos crônicos em seres humanos quando inaladas. Tais efeitos incluem irritação da pele, dos olhos e do trato respiratório, eritemas, tosse, edema pulmonar e necrose. A inalação do produto, mesmo em concentrações baixas, por um período prolongado, pode ocasionar inclusive tumores cancerígenos já relatados em experimentos com ratos. São claras as evidências da carcinogenicidade do acetaldeído em experimentos com animais (IARC, 1985). Através da inalação, o acetaldeído aumenta a incidência de células escamosas cancerígenas e adenocarcinomas na mucosa nasal de ratos de ambos os sexos e carcinomas laringeal em hamsters também de ambos os sexos. Estes estudos mostraram que o risco que o acetaldeído promove está na sua inalação, pois quanto à ingestão do produto, ainda não existe na literatura trabalhos que comprovem algum tipo de risco para a saúde humana.

Estudos realizados por Friedrich e Acree (1998) mostraram que depois do acetaldeído, o 2,3-butanodiona (diacetil) é o odorante mais potente do iogurte, cuja concentração difere em outros produtos lácteos fermentados. Segundo estes autores, esse composto é conhecido por sua característica manteigosa, ou seja, com aroma cremoso. Este é muito diferente do odorante mais potente em leite cru, que é o hexanoato de etil, que tem um aspecto frutoso, com aroma de abacaxi. Segundo Ott, Fay e Chaintreau (1997), as diferenças nas combinações odorativas do iogurte com as do leite são geradas provavelmente pelo metabolismo das bactérias lácticas, transformando os compostos principais em intermediários, através de um metabolismo parcial.

Imhof e Bosset (1994) sugeriram que o acetaldeído, o 2,3-butanodiona, o 2,3-pentanodiona, o dimetil sulfídrico e o benzaldeído são os compostos mais potentes como odorantes. Em sua pesquisa, o iogurte foi analisado após duas semanas de preparação, pois a geração de compostos aromáticos

sabidamente ocorre principalmente durante a fermentação e não muda significativamente durante o período de estocagem a 4°C.

Ott, Fay e Chaintreau (1997) mostraram que de 91 compostos voláteis identificados como responsáveis pelo “flavor”, 21 exibiram impactos significativos para o aroma, sendo que destes, cinco compostos apresentaram intenso odor. Entre os novos compostos identificados, alguns podem contribuir para o aroma: 1-penten-3-ol; 3-octanona; 2-metil tetrahydroxifuran-3-ona; 3-metil-2-butenol; 2-metiltetrahidrotiofene-3-ona e ácido 2-metilpropanóico. Nesse trabalho foi relatado pela primeira vez a identificação de 1-nonen-3-ona no “flavor” do iogurte e, segundo os autores, este composto foi considerado até agora o mais potente composto aromático já identificado. Embora presente em concentrações baixas, o seu potente poder aromático justifica a sua importância no flavor do iogurte.

Apesar do aroma do iogurte se desenvolver fundamentalmente durante a fermentação, o leite e outros componentes adicionados, podem contribuir para esse aroma. Por exemplo, a percepção global do aroma e do sabor é distinta nos leites de diferentes espécies e os produtos da reação de Maillard que se encontram no leite em pó de má qualidade podem aparecer no iogurte no qual este foi utilizado na fabricação, como defeito no aroma e sabor. As lactonas se formam a partir da gordura durante o aquecimento do leite utilizado na elaboração do iogurte e podem contribuir para o aroma deste produto, assim como também certos compostos como o ácido fórmico, requerimento nutricional do *Lactobacillus bulgaricus*.

O diacetil e a acetoína estão presentes em quantidades muito pequenas no iogurte. Normalmente o conteúdo de acetoína é consideravelmente maior do que o de diacetil. A importância destes para o “flavor” de produtos fermentados, como as culturas de leiteiro e culturas de creme, são bastantes reconhecidas (Ott, Fay e Chaintreau, 1997; Monnet, Schmitt e Divies, 1994).

O diacetil encontra-se em quantidades organolépticamente importantes somente quando na cultura “starter” está presente o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* biovar *diacetylactis* e espécies de *Leuconostoc*. A acetoina, que também existe em quantidades importantes, não possui aroma nem sabor, porém pode oxidar-se a diacetil, tornando o iogurte mais aromático. Embora se encontre em grande quantidade no aroma da manteiga, da cerveja e do vinho, o diacetil está presente no aroma do iogurte em quantidades muito pequenas. Entretanto, como já citado, até mesmo uma quantidade reduzida de diacetil, com traços de 0,01 ppm ou menos, contribui para o agradável e delicado “flavor” acentuado, sendo considerado assim, como um importante componente do aroma do iogurte. De acordo com Groux (1973), a função do diacetil e da acetoina é especialmente importante se o conteúdo de acetaldeído é baixo.

Fix (1993), numa revisão sobre diacetil, mostra que o limiar de detecção (“threshold”) do diacetil é de 0,01 ppm. Porém, Martineau, Acree e Henick-Kling (1995) estudaram o efeito do tipo de vinho no limiar de detecção deste composto e mostraram que os diferentes tipos de vinho afetam a percepção mínima do diacetil, encontrando resultados bem abaixo dos já encontrados (0,005 ppm a 8 ppm). As diluições entretanto, foram feitas em vinhos desacidificados com bicarbonato de sódio, o que pode descaracterizar um pouco o aroma do vinho e conseqüentemente do diacetil.

Na literatura existe pouca informação relacionando o limiar do diacetil com a qualidade do iogurte. No entanto, pode-se verificar que, para bem caracterizar um limiar de detecção de qualquer composto individualmente, este composto puro deve ser diluído em água, para que outros componentes não venham a mascarar o seu aroma original.

A principal fonte de produção de diacetil e acetoina em iogurte é atribuída a algumas linhagens de *Streptococcus thermophilus*. Várias linhagens

destas espécies mostraram diferenças significativas na produção de diacetil e isto indica estar de acordo com o trabalho seletivo das culturas.

Linhagens de *Lactobacillus bulgaricus* produzem somente traços de acetoina, sendo considerado de menor importância no “flavor” do iogurte, comparado com o diacetil (Fernandez-Garcia, 1994).

A transformação de citratos é considerada como sendo a primeira fonte de produção de diacetil e acetoina em iogurte. Em certas circunstâncias a degradação da lactose pode também ser uma fonte de alguma importância (Figura 2).

São considerados de importância limitada para o “flavor” do iogurte, a acetona, a butan-2-ona e outros compostos. Pequenas quantidades de acetona e butan-2-ona usualmente originam-se do leite, mas certas quantidades são produzidas pelas bactérias no iogurte. Porém, a produção destes compostos não ocorre com muita regularidade (Dumont e Adda, 1973).

Ambos os microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* produzem acetona em quantidades variáveis. Em geral, linhagens de *Lactobacillus bulgaricus* que produzem mais acetona do que acetaldeído, dão um leve “flavor” e aroma atípico, enquanto aquelas que produzem uma quantidade consideravelmente maior de acetaldeído do que de acetona, fornecem uma característica muito boa de “flavor” (Varnan e Sutherland, 1994).

A transformação da lactose e a degradação da gordura produzem acetona e butan-2-ona, embora esses compostos já se encontrem presentes no leite em pequenas quantidades.

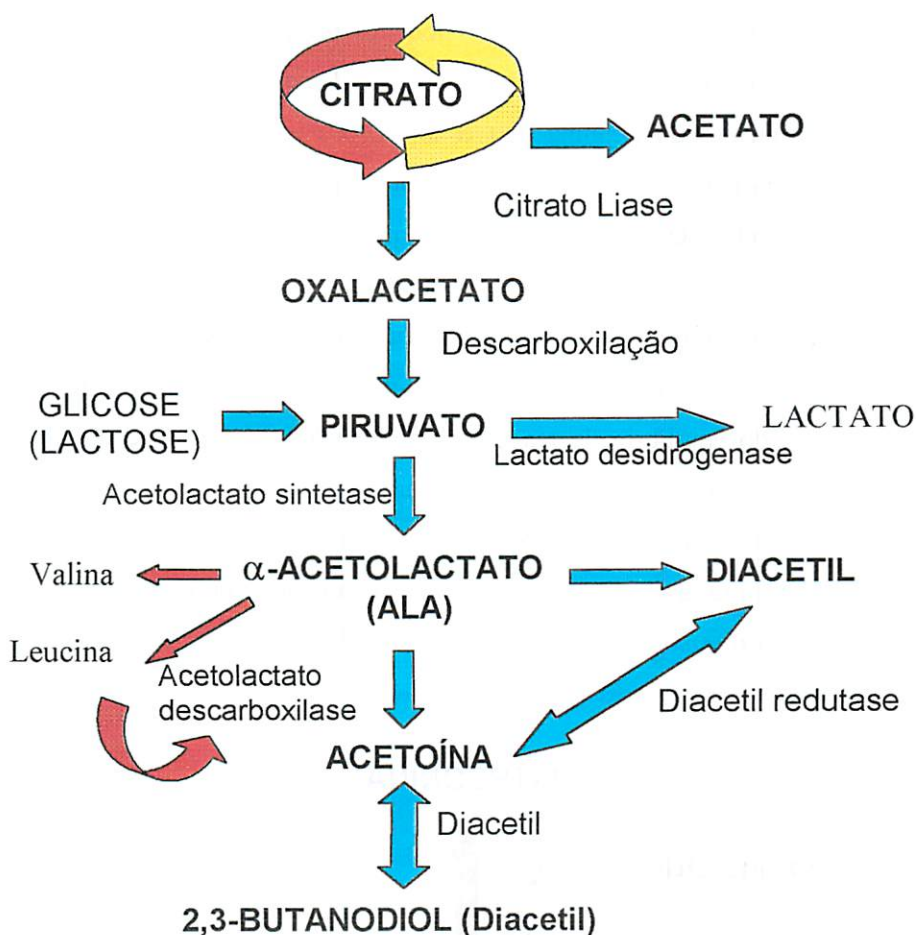


FIGURA 2 Via metabólica da formação de diacetil em *Streptococcus thermophilus* a partir do citrato (Lerayer, Brolazo e Taleb, 2001).

Certos aminoácidos livres podem ser transformados enzimaticamente em amônia e outros compostos, como aldeídos, cetonas e ácidos voláteis. Alguns desses compostos têm contribuído de alguma maneira para o balanço

de substâncias de “flavor” em iogurte. Segundo Keenan e Bills (1968) e Veringa (1973), os estreptococos podem produzir acetaldeído por desdobramento da treonina e da glicina. Já o *Lactobacillus bulgaricus*, somente pelo desdobramento da treonina. Ott et al. (2000) verificaram a origem do acetaldeído durante a fermentação do leite, utilizando precursores com carbonos marcados. Os autores mostraram que a treonina é convertida pela treonina aldolase à acetaldeído e glicina durante a fermentação do leite pelo *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. A pequena quantidade de acetaldeído produzida na presença de glicina pode ser explicada pelo deslocamento do equilíbrio da reação em direção à L-treonina, sendo que a glicina pareceu inibir a rota metabólica em leite fermentado com *Streptococcus thermophilus* (Figura 3). Pelos resultados, observou-se que a atividade da treonina aldolase foi encontrada nos dois microrganismos, sendo mais alta para o *Streptococcus thermophilus* do que para o *Lactobacillus bulgaricus*.

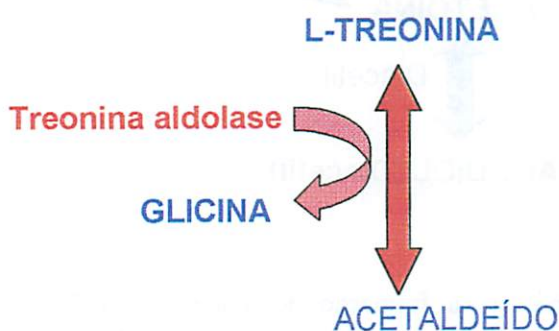


FIGURA 3 Rota metabólica da formação de acetaldeído através da L-treonina (Ott et al., 2000).

Segundo Marranzani et. al. (1989) e Wilkins, Schmidt e Kennedy (1986), a glicina inibiu a formação de acetaldeído ao passo que a treonina

aumentou sua formação, sendo que o *Streptococcus thermophilus* mostrou ser mais sensível à inibição pela glicina do que o *Lactobacillus bulgaricus*.

Ott et al. (2000) citaram que a biossíntese do acetaldeído ainda não está muito bem elucidada, mas consideraram que as rotas da glicose (Figura 1), do citrato (Figura 2) e da L-treonina (Figura 3) são as mais importantes na formação deste composto, além de outros como o diacetil e o etanol. Os autores concluíram que a glicose é o principal precursor do acetaldeído, respondendo por mais de 90% do acetaldeído produzido pelo *Lactobacillus bulgaricus* e quase 100% pelo *Streptococcus thermophilus*, sendo que a treonina contribui somente com uma pequena parte.

Apesar de produzirem os benéficos compostos aromáticos no iogurte, as bactérias lácticas produzem também compostos prejudiciais como o etanol, que influencia negativamente na qualidade do iogurte e diminui a vida útil do produto. O etanol é produzido como resultado da transformação da lactose. As bactérias lácticas produzem etanol em seu metabolismo, porém a quantidade é muito pequena. Alguns autores citam que esta produção não é importante na qualidade do iogurte (Varnam e Sutherland, 1994; Rasié e Kurmann, 1978). No entanto, já existem estudos que comprovam o comprometimento da qualidade do iogurte quando há produção de etanol. Durante o período de incubação, quando está presente no meio a enzima álcool desidrogenase, esta poderá reduzir o acetaldeído em etanol (Brandão, 1980) (Figura 1). Esta reação continua durante o período de estocagem do produto. Segundo Bills e Day (1966), a atividade desta enzima ocorre numa temperatura baixa, ou seja, temperatura de estocagem, por algumas bactérias do gênero *Streptococcus*. Estes microrganismos são capazes de reduzir o acetaldeído, mas não reduzem a acetona. Zourari, Accolas e Desmazeaud (1992) citaram que esta enzima não tem sido encontrada em leites fermentados com *Lactobacillus bulgaricus*, mas tem sido muito presente em culturas de *Streptococcus thermophilus*. Todavia,

Keenan e Lindsay (1967) reportaram a atividade desta enzima por algumas bactérias do gênero *Lactobacillus*.

## **2.4 Ácidos graxos voláteis**

Durante o processo de fabricação do iogurte, o conteúdo de ácidos graxos voláteis aumenta significativamente quando comparado com o presente no leite. O ácido acético é produzido em quantidades consideráveis, seguido pelos ácidos fórmico, capróico, caprílico, cáprico, butírico, propiônico e ácido isovalérico. Como os ácidos graxos de cadeia curta, com baixo peso molecular, são menos voláteis do que o acetaldeído, o diacetil e a acetoína, eles não são considerados como principais componentes de “flavor” em iogurte. Porém, esses ácidos graxos voláteis presentes em iogurtes fabricados com leite de ovelha e cabra têm uma importância maior no “flavor” do que aqueles originados do leite de vaca. Além disso, o conteúdo de acetaldeído em leite de ovelha é muito baixo. Por isso, a diferença organoléptica entre iogurtes feitos com leites de ovelha e vaca é mais pronunciada do que entre os leites destas espécies (Fernandez-Garcia, 1994).

A liberação de ácidos voláteis ocorre como resultado da atividade metabólica de ambos os microrganismos, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*.

## **2.5 Influência dos constituintes do leite no “flavor” do iogurte**

### **2.5.1 Leite Fresco**

O leite fresco tem um leve e delicado “flavor”, sem característica definida. Provavelmente, são as muitas combinações odoríferas que constituem o aroma do leite. Desde que se descobriu que o dimetil sulfídrico é um importante constituinte aromático do leite fresco, um grande número de combinações odoríferas foram identificadas, sendo estas pertencentes a muitas



classes diferentes como combinações de carbonil, alcanóis, ácidos graxos, lactonas, compostos sulfídricos, compostos nitrogenados, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (Veringa, 1973). Todavia, o constante crescimento de microrganismos, a absorção de odores em volta do estábulo ou na sala de ordenha, as falhas na prática de alimentação, a oxidação química, etc., causam prejuízo no “flavor” do leite, como resultado do aparecimento de compostos voláteis, comprometendo obviamente, a qualidade do leite cru, influenciando desfavoravelmente o “flavor” do iogurte (Tamine e Robinson, 1991).

### **2.5.2 Contaminação na fermentação**

Um dos problemas mais graves na indústria de laticínios é a contaminação por vírus que sofrem as bactérias responsáveis pela fermentação. Os vírus bacterianos, também denominados bacteriófagos, são específicos em sua capacidade de ataque a cada espécie microbiana. O principal efeito da infecção das bactérias lácticas por fagos é a diminuição da acidificação do meio devido à morte bacteriana. Como consequência, obtém-se um alimento de qualidade inferior e com uma curta vida de prateleira. Os resultados destas contaminações se traduzem em grandes perdas econômicas (Aquad e Raya, 2001).

Zourari, Accolas e Desmazeaud (1992) ressaltaram que, além de retardar a acidificação durante a fabricação do iogurte, esta contaminação por fagos pode diminuir o crescimento das bactérias lácticas, diminuindo assim o “flavor” do iogurte. Segundo estes autores, na produção atual de iogurtes, o surto de fagos são menos frequentes pois além do tratamento térmico do leite destruir fagos, processos assépticos previnem a contaminação presente no ar. Aquad e Raya (2001) mencionaram que a matéria prima (leite pasteurizado) não é estéril, portanto pode conter bacteriófagos contaminantes, além das bactérias lisógenas (portadoras de fagos atenuados), que impregnam os laticínios, sendo

reservatórios de fagos potencialmente virulentos. Assim, o ataque de fagos pode ocorrer por dois fatores: por contaminação acidental ou pela presença de bactérias lisogênicas. As bactérias lisogênicas podem ser a maior fonte por meio de partículas de fagos latentes provenientes de culturas lisogênicas que infectam culturas da mesma cepa ou por meio de fagos latentes dando origem a mutantes virulentos que são hábeis a superinfecção e lise de culturas parentais lisogênicas ou outros tipos de cultura (Zourari, Accolas e Desmazeaud, 1992).

Como resposta à forte pressão que os bacteriófagos exercem sobre as bactérias lácticas, algumas cepas, principalmente do gênero *Lactococcus*, têm adquirido mecanismos de defesa ao ataque por fagos, porém, ao contrário do que ocorre com as outras bactérias lácticas, tem-se pouca informação documentada sobre os bacteriófagos que atacam o gênero *Lactobacillus*, e em particular o *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*) e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, sendo estas espécies de grande importância por sua aplicação industrial, principalmente na fabricação de iogurtes e bebidas lácteas (Auaud e Raya, 2001).

## 2.6 Características sensoriais

As características sensoriais referem-se ao aroma e sabor do iogurte e ainda, cor, aparência, consistência, viscosidade e textura.

O iogurte distingue-se pelo típico e agradável aroma atribuído à presença de quantidades suficientes de acetaldeído como o principal componente do aroma, realçado sobre um bom balanço de ácidos graxos voláteis e acentuado pela presença de diacetil. O sabor ácido e refrescante do iogurte é atribuído à presença de ácido láctico. A combinação do aroma e sabor produzem o “flavor” do iogurte, descrito como gosto-de-noz (Ott, Fay e Chaintreau, 1997).

O odor característico do iogurte quando a embalagem é aberta, ou seja, o odor encontrado na fase vapor (“headspace”) é a primeira sensação aromática perceptível. Portanto, a qualidade desse odor tem grande influência na preferência do consumidor (Ott, Fay e Chaintreau, 1997).

Iogurtes feitos com leite de ovelha e de cabra são caracterizados por uma espécie de “flavor” diferente do iogurte fabricado com leite de vaca. Isto é provavelmente devido à presença de pequena quantidade de acetaldeído e uma alta quantidade de ácidos graxos voláteis (Badings e Netter, 1980).

O “flavor” do iogurte é afetado pelas propriedades das culturas usadas na sua fabricação, pelos métodos de propagação e conservação da cultura, pela qualidade do leite cru, por tratamentos e processamentos, métodos de incubação e refrigeração, condições de estocagem e outros fatores.

As propriedades físicas do iogurte, como consistência, viscosidade e textura, são influenciadas pela composição do leite, pelo tratamento e processamento, pelas propriedades das culturas, por métodos de incubação e refrigeração e outros fatores, os quais contribuem efetivamente para a apreciação do produto. A tendência é do iogurte apresentar consistência firme e aspecto semelhante ao de creme, devendo possuir uma textura fechada, com ausência de espaços gasosos ou estrutura aberta. A coalhada deve ser macia, sem grãos ou grânulos. A presença de soro na superfície da coalhada e particularmente entre esta é completamente indesejável. Uma moderada viscosidade na coalhada é uma propriedade desejável, especialmente em iogurte batido. Viscosidade baixa ou excessiva é símbolo de qualidade inferior.

O iogurte feito com leite de ovelha é macio e tem uma consistência mais firme do que o iogurte feito com leite de vaca. Isto é devido a maiores proporções de proteínas, gordura e minerais no leite dessa espécie. O iogurte feito com leite de búfala é distinguido pela sua consistência granular estrutural e coloração branca.

As propriedades organolépticas são avaliadas pelos testes organolépticos ou percepção sensorial e são influenciadas pelo odor, sabor e sensação de “flavor” na boca. Estas propriedades também são examinadas pelos testes químicos e físicos, os quais medem o nível de acidez, compostos aromáticos, consistência e viscosidade do iogurte.

## **2.7 Determinação dos compostos voláteis através da cromatografia**

Existem controvérsias em relação à melhor técnica de extração na determinação de compostos voláteis em leites fermentados. Até o momento, dados na literatura não indicaram qual a melhor metodologia a ser utilizada para uma otimização dos resultados, principalmente de quantificação dos principais compostos voláteis.

Segundo Monnet, Schmitt e Divies (1994) a técnica de cromatografia gasosa através da extração com “headspace” automático, tem sido utilizada em experimentos para determinar compostos voláteis em leites fermentados. O ácido  $\alpha$ -acetolático (Figura 2), produzido pelas bactérias lácticas, é um composto instável e é quimicamente transformado em acetoína e diacetil durante o aquecimento a 85°C em amostras de “headspace”, podendo, neste caso, superestimar as concentrações de diacetil em leites fermentados.

Semmelroch e Grosh (1994) injetaram no cromatógrafo amostra de “headspace” e concluíram ser essa técnica a melhor para representar o aroma que é realmente percebível pelo consumidor.

De acordo com Thornhill e Cogan (1984), as análises por cromatografia gasosa pelos métodos convencionais utilizados não são adequadas, porque a água e outros componentes dos produtos lácteos possuem um efeito desfavorável na credibilidade do método. O uso de provas com “headspace” elimina esta desvantagem, porque somente o vapor estará presente, pois o líquido é previamente aquecido, injetando-se apenas o vapor na

coluna. Veringa, Verbug e Stahouders (1984) e Jordan e Cogan (1988) mostraram em seus experimentos que a presença do ácido  $\alpha$ -acetolático foi subestimada porque o composto foi oxidado durante a análise. Bactérias lácticas que utilizam citrato, em particular *Leuconostoc* sp., frequentemente acumulam ácido  $\alpha$ -acetolático em meio de cultura. Monnet, Schmitt e Divies (1994) estudaram a influência do ácido  $\alpha$ -acetolático em ensaios com diacetil, usando cromatografia gasosa através da extração com “headspace”, utilizando para o estudo uma mistura de *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. Os autores mostraram que *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* transformaram o ácido cítrico do leite em diacetil e acetoína em um pH moderado, tendo assim que ser combinado com culturas acidificantes como as espécies de *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis*, com o objetivo de produzir uma coagulação láctica. A produção de diacetil foi investigada no que diz respeito ao potencial de oxiredução e à presença de ácido  $\alpha$ -acetolático, concluindo-se que o potencial de oxiredução foi alto e o ácido  $\alpha$ -acetolático foi parcialmente transformado em diacetil, havendo um aumento considerável desse último em condições aeróbicas.

Keneifel et al. (1992) avaliaram culturas “starters” de mesófilos, verificando suas propriedades bioquímicas, sensoriais e microbiológicas. Para a determinação dos compostos de “flavor” foi utilizada a cromatografia gasosa, sendo a extração feita através do “headspace”, pelo método descrito por Ulberth (1991). Os autores concluíram que o “flavor” das culturas analisadas foi principalmente governado por diacetil, mas foi influenciado pelas concentrações de acetaldeído (Lindsay, Keenan e Day, 1965) mostrando ainda que a produção de diacetil e acetaldeído no teste das culturas variaram consideravelmente. Lindsay, Keenan e Day (1965) informaram que em média a relação de diacetil:acetaldeído é de 4:1 em culturas mesófilas puras produtoras de “flavor”.

Kang, Frank e Lilard (1988) e Ulberth (1991) analisaram compostos voláteis de “flavor” em iogurte pelo método convencional, através da técnica de cromatografia gasosa e encontraram quatro e seis compostos, respectivamente. Laye, Karleskind e Morr (1993) avaliaram compostos voláteis e a influência destes nas propriedades sensoriais do iogurte desnatado, através da cromatografia gasosa. Os autores observaram uma menor concentração de compostos orgânicos voláteis e ácidos orgânicos em relação ao iogurte fabricado com leite integral, resultando em diferenças substanciais no “flavor”, no aroma e na aceitabilidade geral do produto.

Para Ott, Fay e Chaintreau (1997), a técnica de “headspace” e extração-destilação simultâneas (SDE) tem sido comumente usadas para análises de compostos com características de “flavor”. Devido à baixa intensidade de odor em iogurte, a amostra é frequentemente aquecida para aumentar a volatilidade dos compostos de “flavor”, porém, isto pode alterar a composição de alguns compostos aromáticos. Assim, técnicas mais suaves devem ser utilizadas.

A fim de avaliar compostos que contribuem com o aroma e defeitos de “flavor” em bebidas láteas, Heiler e Schieberle (1997) utilizaram a técnica de cromatografia gasosa com amostras de “headspace” estático, mostrando resultados satisfatórios com o uso desta técnica. Esta mesma técnica foi utilizada por Buettner e Schieberle (2000) para estudar a influência de concentrações de aroma de voláteis sobre os aspectos de percepção do flavor, sendo que neste trabalho foi determinado o “flavor” de diversos compostos como acetaldeído, decanal, butanoato de etil entre outros, utilizando-se como padrão interno, o acetaldeído. Mais uma vez, esta técnica mostrou-se adequada para tais determinações.

Diversos trabalhos sobre compostos voláteis em iogurtes foram publicados a partir da década de 50 e até o momento mais de 60 compostos

importantes para o aroma e odor desse produto já foram identificados, através das técnicas de “headspace” e extração-destilação simultâneas (SDE).

Embora exista um grande número de trabalhos publicados no exterior, a bibliografia sobre compostos aromáticos em iogurtes no Brasil é escassa, o que justifica investigações na área.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS.

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Laticínios, Microbiologia, Fisiologia Pós-colheita de Frutos e Hortaliças e de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em quatro fases distintas, como relacionadas a seguir.

#### 3.1 Fase I: Avaliação de iogurtes elaborados com culturas isoladas e mistas

Para avaliar a contribuição que cada microrganismo possui na geração dos principais compostos voláteis do iogurte (acetaldeído e diacetil), bem como a produção de etanol, culturas isoladas, do tipo DVS (Direct Vat Set – uso direto no leite), apresentadas na forma congelada, de cada um dos microrganismos (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) (Quadro 2) e mista dos dois microrganismos, foram inoculadas no leite tratado termicamente, fazendo-se o acompanhamento da geração de compostos aromáticos durante o período de incubação e armazenamento do produto, a cada 7 dias, até atingir 42 dias de armazenamento.

Para a elaboração do leite fermentado com cultura isolada de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, a temperatura de incubação foi de 45° C. Já na elaboração do leite fermentado com cultura isolada de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, a temperatura de incubação foi de 40° C, e na elaboração do leite fermentado com cultura mista, a temperatura de incubação foi de 42° C, conforme indicação do fabricante, sendo o leite utilizado nesta fase o mesmo utilizado para fabricação de iogurtes com culturas comerciais na Fase II.



## QUADRO 2. Características dos microrganismos utilizados na fabricação do iogurte

	Composição	Características	
		Viscosidade	Pós-acidificação
Produto 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Alta	Muito baixa
Produto 2	<i>Lactobacillus delbrueckii subesp. Bulgaricus</i>	Muito alta	Baixa

### 3.2 Fase II: Avaliação de iogurtes elaborados com diferentes culturas comerciais

Nesta fase, foram avaliadas culturas (fermentos) comerciais para iogurte, do tipo DVS (Direct Vac Set - uso direto no leite) liofilizadas, sendo que todas as culturas possuíam como características, viscosidade alta e pós-acidificação média. Estes iogurtes foram avaliados a partir do 2º dia até aos 35 dias de armazenamento, ao contrário do que se verificará na Fase III, na qual foi possível a realização das análises com poucos dias de armazenamento (2, 4, 5, e 6 dias) com o intuito de se observar a produção dos compostos voláteis durante este curto espaço de tempo. Isto seria impossível em iogurtes encontrados no mercado, pois quando o iogurte chega aos pontos de venda, já está, normalmente, com 10 dias no mínimo de armazenamento. Para tanto, foram elaborados iogurtes com culturas adquiridas diretamente dos laboratórios produtores e distribuidores (Quadro 3).

**QUADRO 3** Composição microbiana das culturas utilizadas na fabricação dos iogurtes elaborados no laboratório.

	<b>Composição*</b>
<b>Iogurte 1</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i> , e <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<b>Iogurte 2</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>L. delbrueckii subesp. lactis</i> .
<b>Iogurte 3</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i> , e <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<b>Iogurte 4</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>L. delbrueckii subesp. lactis</i> .

\* Dados fornecidos pelos fabricantes.

### 3.2.1 Fabricação dos iogurtes

Os iogurtes foram fabricados segundo técnicas tradicionais descritas por Rodrigues (1998), utilizando-se para isto, as diferentes culturas mistas comerciais. O processo foi rigorosamente o mesmo para cada cultura, diferenciando somente na quantidade de inóculo, que foi estabelecido de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 4).

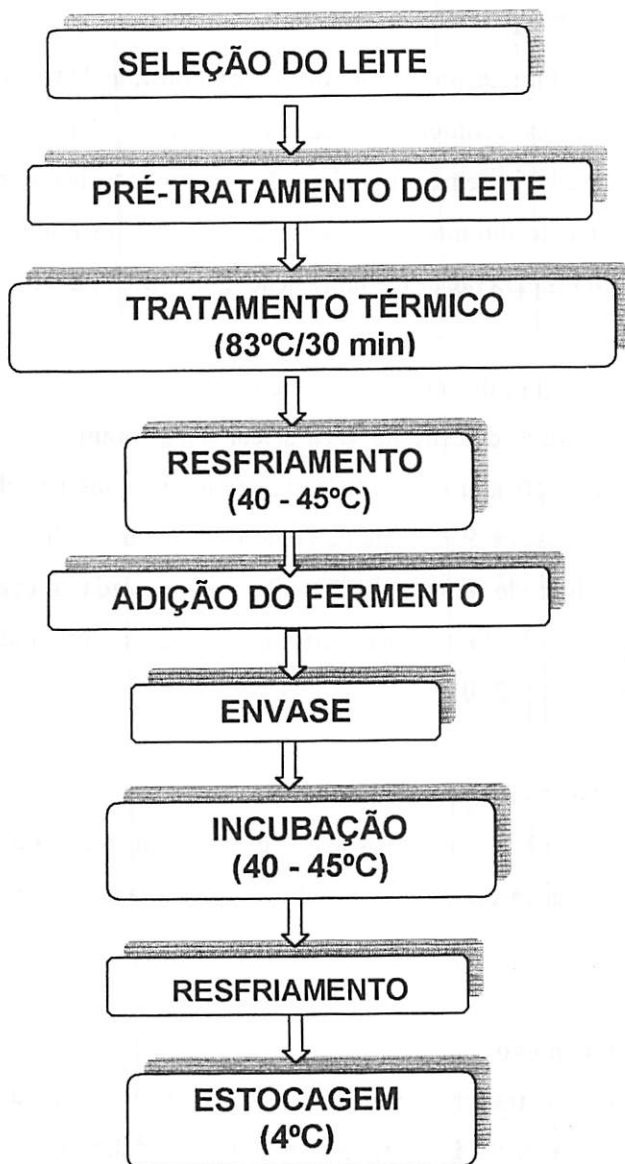


FIGURA 4 Fluxograma do processo de fabricação dos leites fermentados com culturas isoladas e do iogurte

### **3.2.1.1 Matéria-prima**

Para fabricação dos iogurtes, foi utilizado leite proveniente de uma vaca com baixa contagem de células somáticas (341.000 células/ml), para assegurar ausência de mamite, além de não estar recebendo qualquer outro tipo de medicamento durante o período experimental. Este leite foi padronizado a 3% de gordura para posterior fabricação do iogurte “integral”.

### **3.2.1.2 Contagem de células somáticas**

Amostras do leite da vaca selecionada foram enviadas em duplicatas, sendo cada duplicata o resultado das duas ordenhas (manhã e tarde) para o Centro Nacional de Pesquisas de Gado de Leite da EMBRAPA, localizado na cidade de Juiz de Fora - MG, onde foi realizada a contagem de células somáticas através do sistema eletrônico de células somáticas, Bentley combi 2300 (Somacount 300).

### **3.2.1.3 Tratamento térmico do leite**

O leite foi aquecido a 83° C por 30 min, resfriado a 42° C e mantido nesta temperatura durante o período de fermentação dos iogurtes (Rodrigues, 1998).

### **3.2.1.4 Inoculação**

Após o tratamento térmico e resfriamento, o leite foi inoculado com cada fermento separadamente, sendo que a quantidade de inóculo foi de acordo com especificações do fabricante (Rodrigues, 1998).

## **3.3 Fase III: Avaliação dos iogurtes naturais**

Nesta fase, foi feita uma pesquisa sobre os iogurtes naturais (sem açúcar, aromatizantes, corantes e polpas de frutas) comercializados em Lavras

e região, a partir de 14 dias até 42 dias de armazenamento (a cada 7 dias, em triplicata).

### **3.3.1 Coleta de iogurte no mercado**

Foram coletadas amostras das diferentes marcas de iogurte naturais existentes na região. No ato da coleta no mercado foram anotados os seguintes dados: identificação da marca, data de fabricação, prazo de validade, temperatura do local de exposição, volume e tipo de embalagem. Essas amostras foram devidamente acondicionadas em embalagem isotérmica contendo gelo e levadas ao Laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA para serem analisadas.

## **3.4 Análises realizadas nas fases I, II e III**

### **3.4.1 pH**

Foi medido nas amostras previamente aquecidas a 20 °C, utilizando-se um pH-metro da marca MICRONAL, modelo-D474, previamente calibrado. O pH foi medido em todos os iogurtes durante todo o período experimental.

### **3.4.2 Análises cromatográficas**

O método utilizado no preparo das amostras para realização das análises cromatográficas foi o método de “headspace”, segundo adaptações de uma técnica cedida pela Wiesby (Starter Cultures and media).

#### **3.4.2.1 Preparo da amostra**

Num tubo de ensaio com tampa rosqueada com uma perfuração no centro e um septo, acrescentou-se:

- 2,5 mL de iogurte

- 2,5 mL de água destilada e deionizada
- 2,5 g de cloreto de sódio
- 1 mL do padrão interno (butanol)

Levou-se à temperatura de congelamento (em torno de -18°C/24 horas). Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco aquecedor, aumentando-se a temperatura gradativamente até atingir 80° C.

As amostras permaneceram nesta temperatura durante 1 hora, sendo homogeneizadas de 15 em 15 minutos com homogeneizador de tubos tipo Vortex.

#### **3.4.2.2. Injeção das amostras**

Após a homogeneização das amostras, coletou-se 500 µL do “headspace” através do septo, utilizando-se uma seringa tipo Gastight da marca Hamilton, com posterior injeção no cromatógrafo.

As análises dos principais compostos voláteis (acetaldeído e diacetil) e do etanol foram realizadas pelo método de cromatografia a gás adaptado de Ott, Fay e Chaintreau (1997) e Abreu (1993), utilizando-se um cromatógrafo a gás, da marca VARIAN, modelo 3800, conectado a uma “work station”, versão Varian Star 4.5. Coluna cromatográfica Varian-Wax (30 m x 0,320 mm; 0,25 µm). Detector DIC (Detector de ionização de chamas).

As condições do método utilizado na detecção, identificação e quantificação dos compostos foram as seguintes:

**Injetor:**

Modelo: 1079

Temperatura: 200 °C

Razão do Split: 5

Injeção da amostra: 500 µL do “headspace”

**Condições da Coluna:**

Temperatura inicial: 40° C (com tempo de permanência de 10 segundos)

Temperatura final: 65° C (numa taxa de elevação de 4° C/min, permanecendo 1 min. na temperatura final)

Fluxo: 0,7 mL/min

Tempo total da corrida: 7,35 min.

**Detector:**

Tipo: DIC

Temperatura: 200 °C

Sensibilidade: 10<sup>-12</sup> Volts

Atenuação: 1

**3.4.2.3 Identificação dos picos**

Para a identificação dos picos no cromatograma, foram injetados padrões de concentrações conhecidas (acetaldeído, diacetil, etanol e butanol) nas mesmas condições utilizadas para a injeção das amostras, verificando-se assim, o seu tempo de retenção e a temperatura de volatilização.

**3.4.2.4 Quantificação dos picos**

A quantificação dos compostos foi feita através de calibração formada pelos padrões de referência (acetaldeído, diacetil e etanol) e padrão interno (butanol), sendo que todos os padrões são de pureza cromatográfica (Sigma e Aldrich). Como a base utilizada para a diluição destes padrões deveria ser de textura e viscosidade aproximada ao do iogurte, foi necessário então a desodorização de um iogurte, que serviu como base.

### **3.4.2.5 Desodorização do iogurte**

Para fazer a desodorização do iogurte utilizou-se um iogurte desnatado, sendo necessário a utilização de um rotovapor, com a temperatura do banho-maria a 80°C por 5 horas, segundo técnica descrita por Ott et al. (2000).

Após a desodorização, foi necessário rehidratar a amostra com a mesma quantidade de água que foi evaporada, utilizando-se água destilada deionizada.

#### **3.4.2.5.1 Preparo das amostras padrão**

- 2,5 ml de iogurte desodorizado (reidratado)
- 1,5 ml de água destilada deionizada
- 0,5 ml de butanol (20 ppm)
- 0,5 ml de diacetil (20 ppm)
- 0,5 ml de acetaldeído (20 ppm)
- 0,5 ml de etanol (20 ppm)
- 2,5 ml de cloreto de sódio

#### **3.4.2.5.2 Calibração do método**

Para a calibração do método no cromatógrafo, foi necessário, inicialmente informar a concentração de cada padrão e ao final o próprio programa forneceu a quantidade dos padrões na unidade de referência (ppm). Posteriormente, todos os picos das amostras foram identificados de acordo com os padrões utilizados e quantificados em relação ao padrão interno.

### **3.4.3 Relação de cocos e bacilos**

Após a coloração de Gram (Claus, 1992) as lâminas foram avaliadas quanto à contagem em 10 diferentes campos, fazendo-se, a seguir, a média



dessas contagens, a fim de se verificar a proporção de lactobacilos e estreptococos característicos.

Foi realizado também, um levantamento fotográfico de algumas lâminas para ilustrar a relação cocos/bacilos nos iogurtes elaborados com culturas comerciais e de mercado, além da observação do crescimento dos microrganismos durante o período de incubação, no iogurte elaborado com cultura mista. Para este levantamento, foi utilizado uma microcâmera conectada ao microscópio e a um computador.

### 3.5 Fase V: Análise sensorial (obtenção do limiar de detecção do diacetil)

Para a realização da análise sensorial, foram utilizadas cabines individuais do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (Figura 5).

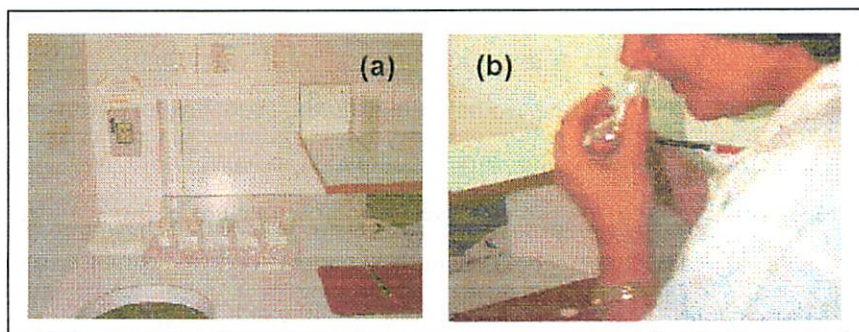


FIGURA 5. Cabine utilizada na análise sensorial (a), momento da prova (b)

### **3.5.1 Recrutamento dos julgadores**

Para que os resultados da avaliação sensorial fossem mais precisos e exatos, houve necessidade de uma seleção prévia e treinamento dos julgadores. Para esta pré-seleção foram convidados 40 candidatos entre professores, funcionários e estudantes do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, independente do sexo, idade, etc. Na Figura 9, estão representadas as etapas realizadas no esquema de análise sensorial.

Foi realizada uma reunião com as 40 pessoas e expostas as responsabilidades de cada um (pontualidade, disponibilidade de tempo, atenção, cuidados de não fumar e nem ingerir qualquer produto que pudesse prejudicar a realização do teste, no prazo de uma hora antes das provas).

### **3.5.2 Seleção dos julgadores**

Para a seleção dos julgadores, foi necessário identificar a capacidade individual de reconhecimento de aromas, através de um teste específico para o reconhecimento de aromas. Para este teste foram utilizados vários tipos de produtos, usados no dia a dia (alimentos ou não) (Figura 6), colocados em erlenmeyers de 125 ml de rolha esmerilhada, codificados com números aleatórios de 3 dígitos, que foram tampados e envolvidos em alumínio, contendo quantidades mínimas desses produtos a serem identificados, como: chocolate, abacaxi, alho, cebola, baunilha, canela, cigarro, esmalte, morango, maçã, banana, etc. Foram selecionados 17 dos 40 candidatos.

## TESTE DE RECONHECIMENTO DE AROMAS

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Os frascos tampados contém substâncias odoríficas comumente encontradas em casa ou no local de trabalho. Leve o frasco até o nariz, remova a tampa, faça 3 inaladas e tente identificar o aroma. Se você não conseguir encontrar o aroma exato da substância, tente descrever alguma coisa que possa lembrá-lo.

Nº da Amostra	Descrição

**FIGURA 6** Modelo de ficha-resposta empregada na seleção dos provadores, no teste de reconhecimento de aromas

### 3.5.3 Teste de ordenação com diacetil

Logo após o teste de reconhecimento de aromas, foi feito o teste de ordenação com diacetil, sendo para isto utilizado o diacetil (2,3 butanodiona) da marca Sigma, de pureza cromatográfica, diluído em água destilada e deionizada em diversas concentrações. Quatro a seis amostras foram apresentadas, sendo solicitado ao julgador que as ordenasse em ordem de concentração (da mais concentrada para a menos concentrada e vice-versa) (Figura 7). Em erlenmeyers tampados e codificados, foram colocados 2 ml da amostra, iniciando-se com cinco concentrações que variavam de 100 a 6,25 ppm, para que os julgadores pudessem se familiarizar com o aroma do produto, diminuindo-se gradativamente, até atingir o limiar de detecção. Dos 17 julgadores, foram selecionados somente 12 que obtiveram resultados adequados.

**TESTE DE ORDENAÇÃO**

Produto: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2001

Você está recebendo 5 amostras para identificação de aroma. Cheire da esquerda para a direita e ordene em ordem decrescente de intensidade de aroma (aroma mais forte em primeiro lugar). Limpe as narinas antes, e entre cada amostra.

Amostras: \_\_\_\_\_

Ordenação: \_\_\_\_\_

Amostras: \_\_\_\_\_

Ordenação: \_\_\_\_\_

Observações:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**FIGURA 7** Modelo de ficha-resposta empregada no teste de ordenação com diacetil

### 3.5.4 Teste de limites de diacetil

Para o teste de limites, o produto foi pipetado no momento em que o julgador já se encontrava na cabine. As amostras foram fornecidas uma de cada vez e o julgador foi orientado sobre como proceder (Figura 8). As amostras

foram apresentadas em ordem crescente e decrescente de concentrações, sendo que a apresentação das amostras continuou até que o mesmo julgamento (“detecção” para série crescente e “não detecção” para série decrescente) ocorresse em duas apresentações sucessivas dentro da mesma série, sendo que as séries crescentes e decrescentes foram apresentadas uma após outra (ABNT, 1994). Obtidos os dados, estes foram colocados num quadro (Quadro 4), e o limiar foi obtido através da média geométrica de cada julgador, da concentração mais alta “não detectada” e a concentração seguinte, sendo o resultado a média geométrica dos limiares dos 12 provadores (ABNT, 1994).

<b>TESTE DE LIMITES</b>				
Produto:				
Nome:		Data:		
<p>Você está recebendo amostras para identificação de aroma. Cheire e indique se você detecta ou não a presença do diacetil. Em caso positivo marque a amostra com o número 1; em caso negativo marque zero. Limpe as narinas antes, e entre cada amostra.</p>				
Amostras:				
Detecção:				
Amostras:				
Detecção:				
Comentários:				

**FIGURA 8** Modelo de ficha-resposta empregada no teste de limite, para obtenção do limiar de detecção do diacetil.

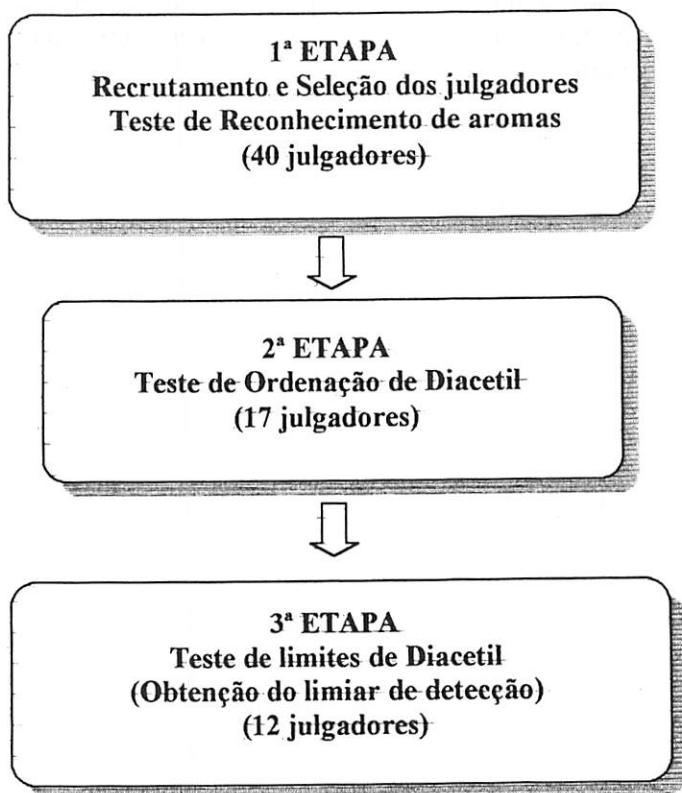


FIGURA 9 Esquema da análise sensorial, referente ao teste do limiar de detecção do diacetil.

Fórmula da média geométrica:

$$M = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$$

onde:  
M = média geométrica  
 $x_n$  = concentração  
n = n° observações

Foi utilizada a mesma fórmula para calcular as médias de todos os julgadores e no final obteve-se o limiar de detecção através da média geral de todos os julgadores.



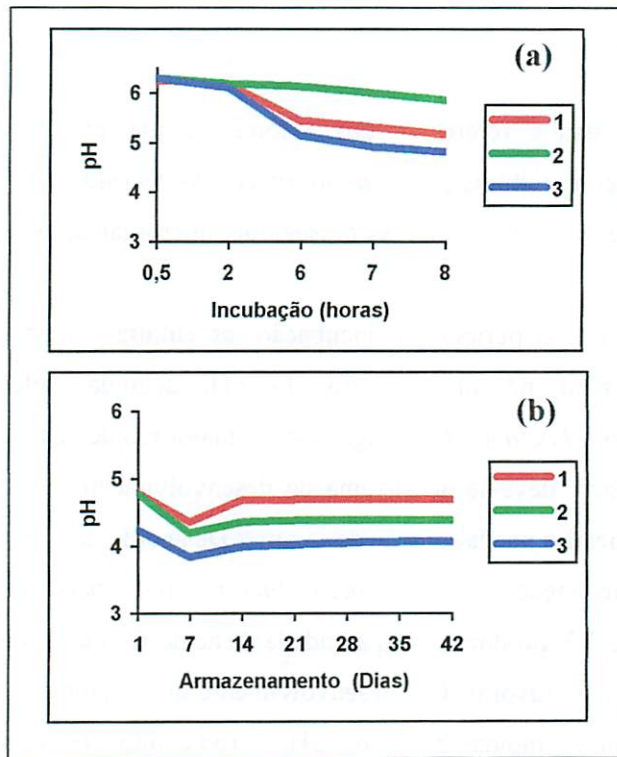
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 pH

Os dados referentes aos valores de pH dos leites fermentados produzidos com culturas puras de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e das culturas mistas desses dois microrganismos encontram-se na Figura 10.

Durante o período de incubação, as culturas mistas demonstraram mais eficiência no abaixamento do pH, seguida pelo *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. A maior rapidez em abaixar o pH, das culturas mistas, deve-se ao sistema de desenvolvimento simbiótico das duas culturas utilizadas na elaboração do iogurte. De acordo com Ferreira (1993), no início da incubação, o *Streptococcus thermophilus* abaixa o pH até valores próximos de 5,5, produz certa quantidade de ácido fórmico, consome oxigênio, tomando o meio favorável ao desenvolvimento do *Lactobacillus bulgaricus*, o qual, diminui rapidamente o pH, produzindo também considerável concentração de acetaldeído e diacetil.

Pela ação de enzimas bacterianas, a lactose do leite é fermentada a ácido láctico, como principal produto final. O acúmulo desse ácido causa o abaixamento do pH, o qual ao atingir certos valores, provoca a perda de solubilidade da caseína, promovendo sua floculação, transformando o leite em um produto gelatinoso, conhecido como coalhada.



(Produto 1: *Streptococcus thermophilus*; Produto 2: *Lactobacillus bulgaricus*; Produto 3: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*).

FIGURA 10 Valores médios do pH durante o período de incubação (a) e até 42 dias de armazenamento (b), em produtos elaborados com cultura pura de estreptococos, cultura pura de lactobacilos e cultura mista de lactobacilos e estreptococos.

Além do ácido láctico, comum a todos os processos de fermentação da lactose, diferentes microrganismos produzem diferentes compostos secundários. No caso particular da presença de *Streptococcus thermophilus* e

*Lactobacillus bulgaricus*, ocorre uma produção de acetaldeído e diacetil, originando um leite fermentado conhecido como iogurte.

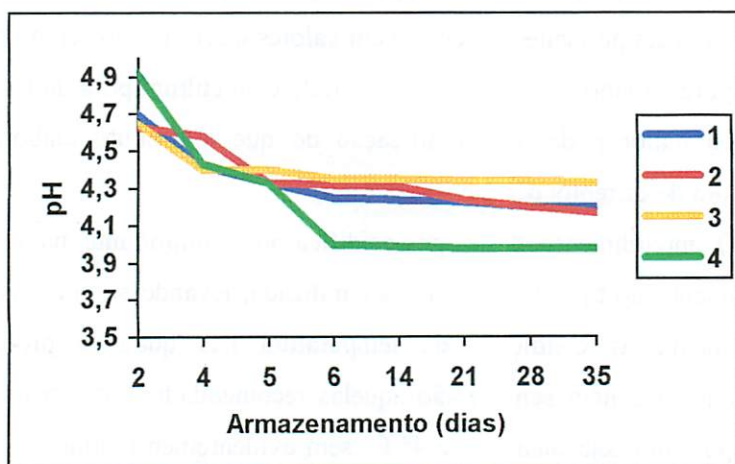
A cultura mista foi capaz de, em 8 horas de incubação, abaixar o pH de 6,30 para 4,80, enquanto as culturas isoladas alcançaram no mesmo tempo de incubação, valores de pH de 5,18 para o *Streptococcus thermophilus* e de 5,87 para *Lactobacillus bulgaricus* (Figura 10), confirmando o conhecimento já completamente elucidado, de que existe um forte sinergismo entre essas duas espécies de microrganismos. Devido à utilização de culturas congeladas, sem ativação, os períodos de tempo nas incubações foram mais longos do que aqueles obtidos quando da utilização de culturas Dri-vac, previamente ativadas.

No período de armazenamento (Figura 10), o pH do leite fermentado por cultura mista permaneceu sempre em valores inferiores aos elaborados com culturas puras, sendo que o produto elaborado com cultura pura de lactobacilos apresentou maior poder de acidificação do que o produto elaborado com cultura pura de estreptococos, nesse período.

O entendimento dessa pós-acidificação é importante na tomada de decisão quanto ao tipo de cultura a ser utilizada, levando-se em consideração principalmente as condições de temperatura nas quais o produto será armazenado, que nem sempre são aquelas recomendadas, pois o ideal é que esta temperatura seja menor que 4° C, sem evidentemente atingir o ponto de congelamento. Desta forma, a relação cocos/bacilos a ser usada, deverá estar na proporção direta da temperatura de armazenamento, ou seja, temperaturas maiores, maior relação cocos/bacilos.

Durante o período de armazenamento de iogurtes fabricados com diferentes culturas lácticas, ocorreu um decréscimo relativamente acentuado no pH até o quinto dia de armazenamento (Figura 11), sendo que um dos iogurtes teve esse abaixamento extendido até o 6º dia. No período de estocagem destes iogurtes, observa-se que o pH manteve-se praticamente constante. Esta

constância nos valores de pH durante o período de estocagem do produto é devido ao fato que os microrganismos são termofílicos e numa temperatura de baixa, como a utilizada neste trabalho (aproximadamente 4° C) interrompem o seu crescimento, fazendo cessar a acidificação do meio, tornando então os valores de pH sempre constantes. Todos os iogurtes analisados, tanto os fabricados no laboratório como os obtidos no mercado, tiveram valores de pH condizentes com os encontrados na literatura, ou seja, numa faixa de 3,9 a 4,3, sendo esta faixa considerada ótima para um produto de qualidade (Ferreira, 1993 e Tamine e Robinson, 1991).



(**Iogurte 1:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*; **Iogurte 2:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus lactis*; **Iogurte 3:** *Streptococcus thermophilus*, e *Lactobacillus bulgaricus*; **Iogurte 4:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus lactis*).

FIGURA 11 Valores médios do pH em iogurtes elaborados com culturas comerciais durante o período de armazenamento.

Os dados referentes aos valores de pH dos iogurtes adquiridos no mercado encontram-se na Figura 12.

Todos os iogurtes foram adquiridos com 14 dias de fabricação, levando-se em consideração a sua rotulagem.

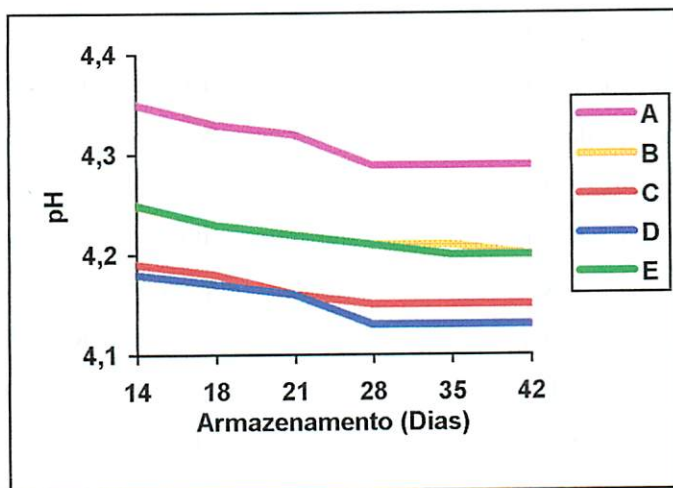


FIGURA 12 Valores médios do pH em iogurtes obtidos no mercado local durante o período de armazenamento.

Os iogurtes apresentaram valores de pH dentro da faixa estabelecida como normal para iogurte. Não se pode precisar as causas das variações encontradas, pois os processos de fabricação, conservação e transporte variam de marca para marca, principalmente no que se refere à temperatura e esse fator tem grande influência no desenvolvimento microbiano e na atividade enzimática do iogurte. Além disso, as diferentes marcas comerciais podem utilizar diferentes culturas com diferentes aptidões de acidificação.

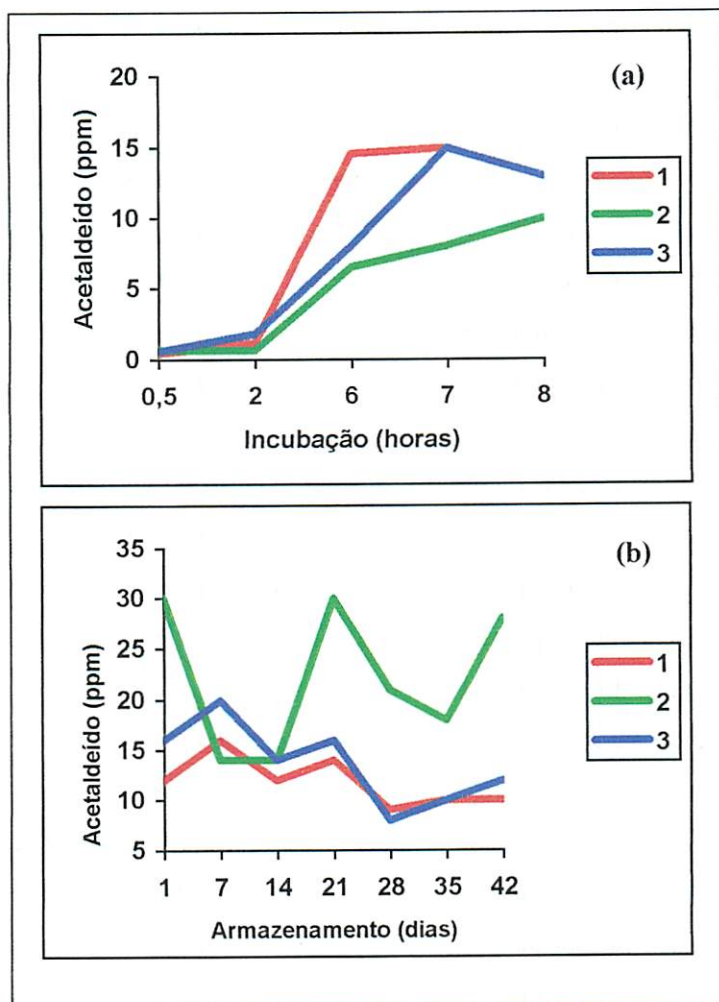
## 4.2 Acetaldeído

É vasta a literatura internacional abordando concentrações de acetaldeído em iogurtes. Entretanto esse tipo de informação é praticamente inexistente para os produtos elaborados no Brasil.

Os dados referentes à produção de acetaldeído em produtos fermentados com culturas puras de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e mistas, encontram-se na Figura 13.

Durante o período de incubação, a produção de acetaldeído no produto elaborado com cultura pura de *Streptococcus thermophilus* experimentou a maior elevação até 6 horas de incubação, seguida pelo produto elaborado com cultura mista e pelo produto elaborado com cultura pura de *Lactobacillus bulgaricus*. Após este período, no produto elaborado com *Streptococcus thermophilus*, houve a interrupção na produção de acetaldeído, o que está de acordo com Ferreira (1993) que relatou que o *Streptococcus thermophilus* tem o seu crescimento interrompido em pH 5,5 (Figura 10).

Embora o *Lactobacillus bulgaricus* seja o principal produtor de acetaldeído no iogurte, o produto elaborado com *Streptococcus thermophilus* apresentou uma maior produção deste composto no período de incubação (Figura 13). Como as condições do meio no início da fermentação (pH elevado, presença de oxigênio) favoreciam o crescimento do *Streptococcus thermophilus*, a população deste elevou-se de forma acentuada, enquanto que a de *Lactobacillus bulgaricus* somente iniciou o seu crescimento após algumas horas, quando o meio lhe passou a ser favorável (pH abaixo de 5,5, certa concentração de ácido fórmico), ou seja, no período de armazenamento.



(**Produto 1:** *Streptococcus thermophilus*; **Produto 2:** *Lactobacillus bulgaricus*; **Produto 3:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*).

FIGURA 13 Concentração de acetaldeído em leites fermentados elaborados com culturas puras e mistas, desde o momento da incubação até 42 dias de fabricação.

A lentidão no desenvolvimento do *Lactobacillus bulgaricus* quando em cultura pura, acarretou uma menor produção de acetaldeído durante o período de incubação.

O *Lactobacillus bulgaricus*, quando cultivado isoladamente, apresenta uma longa fase “lag” de crescimento, a partir da qual seu desenvolvimento atinge grandes velocidades. Isso indica que é necessário um longo período até que o meio se torne favorável ao seu desenvolvimento. Quando o *Lactobacillus bulgaricus* cresce em simbiose com o *Streptococcus thermophilus*, este último prepara rapidamente o meio para o *Lactobacillus bulgaricus*.

Observa-se na Figura 13, que a produção de acetaldeído pela cultura pura de *Lactobacillus bulgaricus* foi muito baixa durante o período de incubação, entretanto após 24 horas de armazenamento a 4 °C, ultrapassou a produção pela cultura pura de *Streptococcus thermophilus* e pela cultura mista. Ao contrário do *Streptococcus thermophilus*, que tem o seu crescimento interrompido em pH 5,5, o *Lactobacillus bulgaricus* prefere meios mais ácidos para o seu desenvolvimento.

Tamine e Robinson (1991) relataram que a maior produção de acetaldeído se dá quando os dois microrganismos multiplicam em simbiose. Porém, outros pesquisadores julgam o papel do *Lactobacillus bulgaricus* mais importante na produção deste composto. Ficou claro pelos resultados obtidos, que o *Lactobacillus bulgaricus* é o principal produtor de acetaldeído, embora essa produção inicia-se mais tarde do que para o *Streptococcus thermophilus*.

Georgala et al. (1999) analisaram cepas isoladas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* inoculadas em leite de ovelha e, após 5 dias de estocagem a 4° C, obtiveram valores bem mais altos de acetaldeído nos leites fermentados somente com *Lactobacillus bulgaricus* do que nos leites fermentados com *Streptococcus thermophilus*. Neste trabalho, apesar de ter



sido utilizado leite de ovelha, pode-se observar a maior eficiência do lactobacilos em produzir acetaldeído.

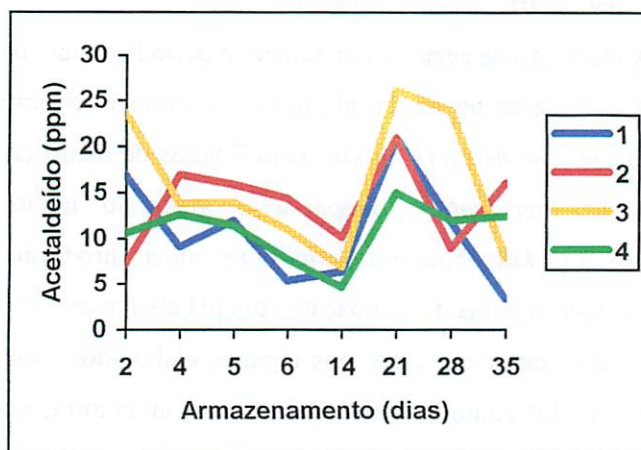
A taxa de produção de acetaldeído é altamente dependente do nível de acidificação, sendo que sua formação começa a um pH próximo a 5,0, aumentando rapidamente em um valor de pH próximo a 4,3. Após isso, há um pequeno aumento e estabilização em um valor de pH de aproximadamente 4,0 (Bottazzi, Battistotti e Vescovo, 1971).

A produção de acetaldeído durante o período de incubação por culturas mistas foi mais lenta no início, alcançando a mesma concentração da cultura pura de *Streptococcus thermophilus* com 7 horas de incubação. Nesse caso, o *Streptococcus thermophilus* preparou o meio no início da incubação, permitindo ao *Lactobacillus bulgaricus* uma produção acentuada de acetaldeído após 6 horas de incubação, num pH abaixo de 5,0 (Figura 10).

Pode-se notar que tanto nos iogurtes elaborados com culturas puras e mistas (Figura 13) como naqueles elaborados com culturas comerciais (Figura 14) fabricadas no laboratório, após 21 dias de estocagem houve um decréscimo na produção de acetaldeído, sendo que a concentração de acetaldeído variou de 15,07 a 30 ppm.

Brandão (1980) mostrou que a estocagem do iogurte diminuiu a concentração de acetaldeído, verificando, em seu estudo, que o maior pico foi encontrado aos 14 dias de estocagem e a partir deste dia, a concentração começou a diminuir em todos os iogurtes avaliados. Nas Figuras 13 e 14 pode-se observar também uma tendência de diminuição da concentração de acetaldeído após 21 dias. Laye, Karkleskind e Morr (1993) analisaram, entre outras características, o conteúdo de acetaldeído em 4 diferentes iogurtes e mostraram que em todos houve um decréscimo deste composto após 12 dias de estocagem, sendo que a partir deste período, estas amostras não mais foram avaliadas. Pode-se observar na Figura 14, que o conteúdo de acetaldeído

decreceu até 14 dias de estocagem, mas em seguida teve um aumento acentuado aos 21 dias e logo após o pico de máxima concentração, houve novamente um decréscimo. Portanto, não se pode afirmar que o conteúdo de acetaldeído diminui substancialmente durante o período de estocagem.



**(Iogurte 1:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*; **Iogurte 2:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Lactis*; **Iogurte 3:** *Streptococcus thermophilus*, e *Lactobacillus bulgaricus*; **Iogurte 4:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *Lactis*).

FIGURA 14 Concentração de acetaldeído em iogurtes elaborados com culturas comerciais durante o período de armazenamento.

A concentração de acetaldeído durante o período de armazenamento do iogurte não se apresentou de forma crescente pois, apesar de ter havido uma produção constante, embora com velocidades menores que as verificadas no período de incubação, esse composto apresentou uma alta volatilidade.

Um dos grandes problemas do mercado de iogurte é a falta de temperatura baixa controlada durante os processos de transporte e conservação do produto. Elevações na temperatura acarretam uma pós-acidificação, diminuindo a vida útil do iogurte. Para contornar esse problema, as indústrias fazem opção por culturas que possuem características de baixa pós-acidificação, o que é conseguido utilizando-se culturas com alta relação cocos/bacilos, o que leva necessariamente à baixa produção de acetaldeído.

Observa-se que houve uma variação muito grande na produção de acetaldeído, variando de 11 a 35 ppm aos 21 dias de armazenamento nos iogurtes obtidos no mercado (Figura 15). Esta grande variação pode ser devido às cepas utilizadas. Entretanto, pode-se adiantar que estas não são muito diferentes das utilizadas neste estudo, visto que as indústrias que cederam as culturas são as mesmas que fornecem àquelas produtoras de iogurte. Porém, existem outros tipos de culturas mistas que estas indústrias fabricam, as quais podem estar sendo utilizadas pelas indústrias produtoras de iogurtes e que certamente se comportarão de maneira diferente.

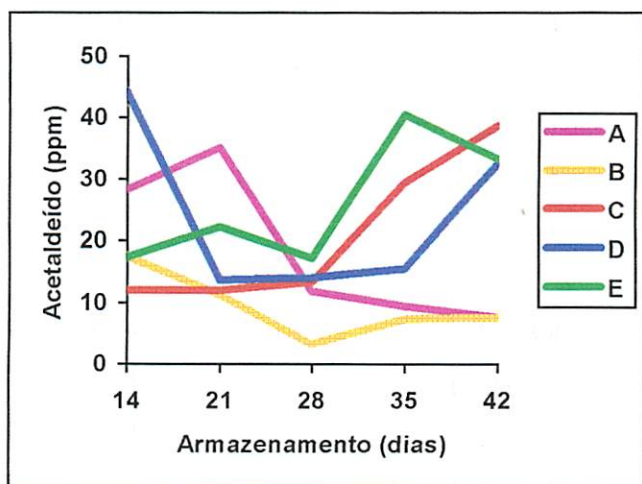


FIGURA 15 Concentração de acetaldeído em iogurtes obtidos no mercado

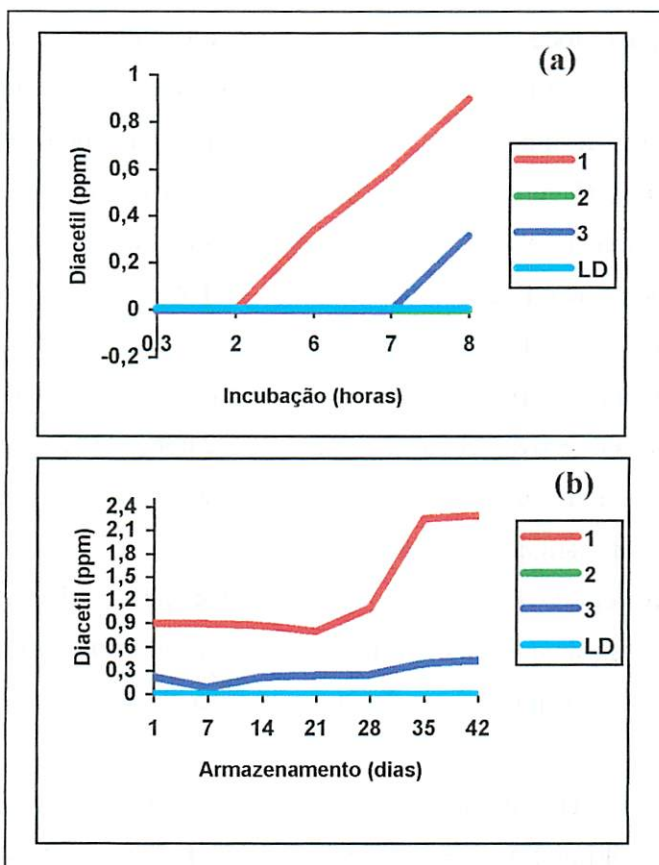
Uma observação importante a ser comentada, é que houve uma variação bem menor na concentração de acetaldeído nos iogurtes elaborados com culturas comerciais (Figura 14) do que nos iogurtes obtidos no mercado (Figura 15) durante o período de armazenamento. Isto pode ser explicado pelo maior controle da temperatura de estocagem do produto fabricado no laboratório do que daqueles adquiridos no mercado.

Observa-se ainda, comparando-se os iogurtes elaborados com culturas comerciais e os obtidos no mercado, que nos iogurtes elaborados com culturas comerciais (Figura 14), a produção de acetaldeído durante todo o período de armazenamento foi menor do que para os obtidos no mercado (Figura 15). Provavelmente isto ocorreu em função da diferença entre as culturas utilizadas na indústria e as deste trabalho, visto que existem outras cepas, compostas de microrganismos diferentes, além das condições tecnológicas diferirem das condições encontradas na indústria.

### **4.3 Diacetil**

O diacetil é tido como o segundo principal componente do “flavor” do iogurte. Sua importância se dá principalmente por seu aroma “manteigoso” ou “cremoso” que juntamente com o acetaldeído e outros compostos, constituem o chamado “flavor” do iogurte. Apesar de ser encontrado em pequenas quantidades, o diacetil é um componente potente, pois a concentração mínima perceptível é muito baixa, ficando próxima de 0,01 ppm (Fix, 1993 e Stien et al., 1999).

Os dados referentes à produção de diacetil desde o momento da incubação até 42 dias após a fabricação, em produtos elaborados com cultura pura de estreptococos, cultura pura de lactobacilos e mista de lactobacilos e estreptococos, estão apresentados na Figura 16.



(**Produto 1:** *Streptococcus thermophilus*; **Produto 2:** *Lactobacillus bulgaricus*; **Produto 3:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*). **LD** = Limiar de detecção.

FIGURA 16 Concentração de diacetil desde o momento da incubação (a) até 42 de armazenamento (b), em produtos elaborados com cultura pura de estreptococos, cultura pura de lactobacilos e mista de lactobacilos e estreptococos.

Para Bottazi, Battistotti e Montescani (1973), o principal microrganismo produtor de diacetil é o *Streptococcus thermophilus*, sendo que o *Lactobacillus bulgaricus* tem uma importância insignificante na produção

deste composto. A cultura pura de *Lactobacillus bulgaricus* não produziu diacetil durante todo o período experimental; ao contrário, a cultura pura de *Streptococcus thermophilus*, teve uma alta produção quando inoculada isoladamente, seguida pela cultura mista, que apresentou uma produção intermediária (Figura 16). Georgala et al. (1999) trabalhando com leite de ovelha, obtiveram valores similares aos encontrados neste trabalho, não encontrando diacetil quando inocularam o leite com culturas puras de *Lactobacillus bulgaricus*.

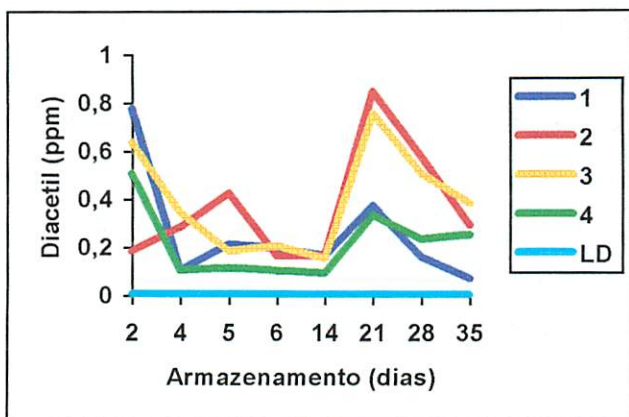
Durante o período de incubação (Figura 16), a produção de diacetil nas culturas puras de estreptococos teve início com 2 horas de incubação, bem mais cedo do que a cultura mista (estreptococos e lactobacilos), que iniciou a produção de diacetil com 7 horas de incubação.

No período de armazenamento, a produção de diacetil começou a aumentar drasticamente após 21 dias nas culturas puras de estreptococos e nas mistas. Este aumento foi moderado e aconteceu a partir do 28º dia de armazenamento.

Apesar da produção de diacetil ter sido relativamente baixa (variando de 0,09 a 0,44 ppm) nos iogurtes elaborados com culturas mistas (Figura 16), observa-se que o limiar de detecção (LD) deste composto ainda é abaixo das concentrações encontradas, o que reforça a idéia do diacetil ser um dos principais compostos que conferem aroma ao iogurte, sendo considerado o segundo composto aromático mais potente neste produto, após o acetaldeído.

Através da Figura 17, verifica-se a evolução do diacetil em iogurtes elaborados com culturas comerciais durante o período de armazenamento. Observa-se que o pico de produção deste composto, em todos os iogurtes foi aos 21 dias, sendo que isto também foi observado quando se analisou o acetaldeído (Figura 14).





**(Iogurte 1:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*; **Iogurte 2:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*; **Iogurte 3:** *Streptococcus thermophilus*, e *Lactobacillus bulgaricus*; **Iogurte 4:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*)  
**LD** = Limiar de detecção

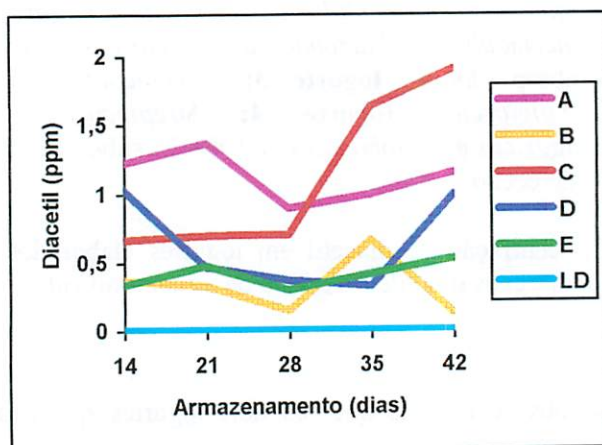
FIGURA 17 Concentração de diacetil em iogurtes elaborados com culturas comerciais durante o período de armazenamento.

Pode-se observar ainda que, os dois iogurtes que produziram uma maior quantidade de diacetil (Iogurtes 2 e 3) também foram aqueles que produziram uma maior quantidade de acetaldeído. Do mesmo modo, aqueles que produziram uma menor quantidade de diacetil (Iogurtes 1 e 4), também foram os menos aromáticos em relação ao acetaldeído (Figuras 17 e 14, respectivamente).

Um fato importante a ser observado é que, quando foram inoculadas culturas mistas de cocos e bacilos a produção de diacetil foi baixa (variando de 0,09 a 0,44 ppm) (Figura 16). Já nos iogurtes elaborados com culturas comerciais também mistas, a faixa de produção foi maior (0,10 a 0,78 ppm) (Figura 17). Isto pode ser explicado devido a relação de cocos para bacilos,

nos fermentos comerciais, ser muito elevada (Figura 23), com insignificante número de lactobacilos, justificando assim a alta produção de diacetil, pois a presença de lactobacilos pode inibir a produção desse composto.

Nos iogurtes obtidos no mercado (Figura 18), houve uma variação muito grande na produção de diacetil (0,10 a 1,91 ppm). O iogurte que produziu uma menor quantidade de diacetil (Iogurte B), também foi aquele que produziu uma menor quantidade de acetaldeído (Figura 15) durante todo o período experimental.



**LD** = Limiar de detecção

FIGURA 18 Concentração de diacetil em iogurtes obtidos no mercado

Em média, os iogurtes obtidos no mercado foram mais aromáticos do que aqueles elaborados com culturas comerciais, tanto na produção de diacetil como na de acetaldeído. Provavelmente, isso ocorreu devido a diferenças entre as cepas utilizadas ou mesmo à tecnologia de fabricação diferir em algum aspecto em relação à indústria.

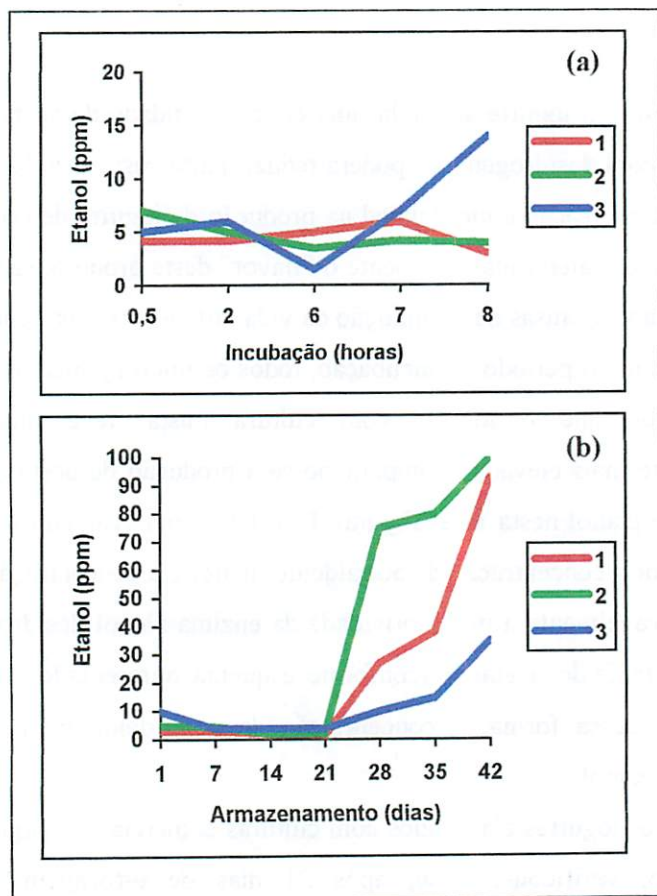


#### 4.4 Etanol

Quando o iogurte acumula uma certa quantidade de acetaldeído, uma enzima, a álcool desidrogenase, poderá reduzir parte deste acetaldeído a etanol (Figura 1). Esta reação é indesejável na produção de iogurte de boa qualidade, visto que poderá afetar marcadamente o “flavor” deste produto, sendo uma das mais importantes causas de diminuição da vida útil de leites fermentados.

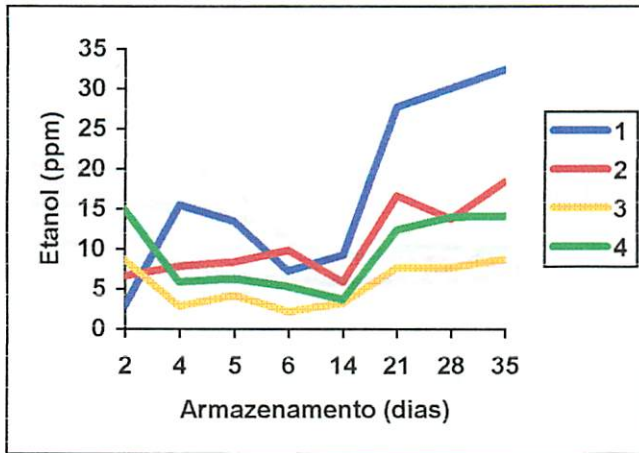
Durante o período de incubação, todos os microrganismos produziram etanol, sendo que o iogurte com cultura mista, teve uma produção relativamente mais elevada. Comparando-se a produção de acetaldeído com a produção de etanol nesta fase (Figuras 13 e 19, respectivamente), nota-se que quanto menor a concentração de acetaldeído, maior é a concentração de etanol, devido, provavelmente à maior atividade da enzima álcool desidrogenase, que reduz o acetaldeído a etanol (conforme esquema apresentado na Figura 1), diminuindo, dessa forma, a concentração de acetaldeído com consequente aumento do etanol.

Já nos iogurtes elaborados com culturas comerciais e naqueles obtidos no mercado, verificou-se que, após 21 dias de estocagem, quando as concentrações de acetaldeído atingiram seu máximo (Figura 14 e 15), com posterior declínio, houve uma elevação nas concentrações de etanol (Figuras 20 e 21).



(**Produto 1:** *Streptococcus thermophilus*; **Produto 2:** *Lactobacillus bulgaricus*; **Produto 3:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*).

FIGURA 19 Concentração de etanol durante o momento da incubação até 42 dias de armazenamento, em iogurtes elaborados com cultura pura de estreptococos, cultura pura de lactobacilos e cultura mista de lactobacilos e estreptococos.



(**Cultura 1:** *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*; **Cultura 2:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*; **Cultura 3:** *Streptococcus thermophilus*, e *Lactobacillus bulgaricus*; **Cultura 4:** *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*).

FIGURA 20 Concentração de etanol em iogurtes elaborados com culturas comerciais durante o período de armazenamento.

Nos iogurtes obtidos no mercado, aquele que mostrou produção menor de acetaldeído (Iogurte B), foi o que produziu maior quantidade de etanol, confirmando a existência da atividade da enzima álcool desidrogenase. Após 21 dias de armazenamento, os iogurtes de mercado (Figura 21) tiveram uma faixa menor de produção de etanol (3,3 a 40 ppm), quando comparados com os iogurtes elaborados com culturas comerciais (Figura 20).

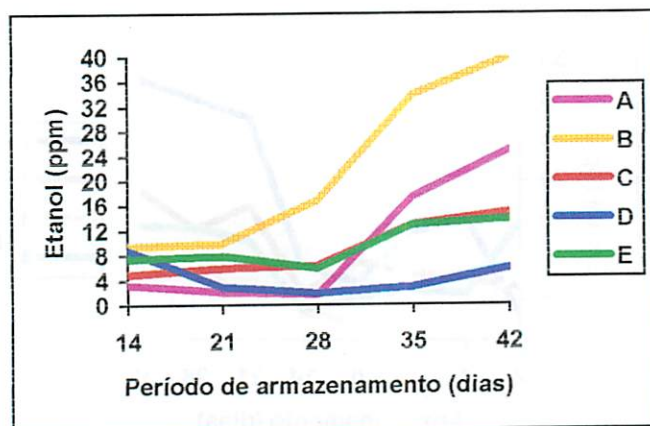


FIGURA 21 Valores médios encontrados para o etanol em iogurtes obtidos no mercado

Isto pode explicar a maior concentração de acetaldeído nesses iogurtes (Figura 15) do que nos elaborados com culturas comerciais (Figura 14), ou seja, houve uma menor redução de acetaldeído a etanol nos iogurtes de mercado. Brandão (1980), em seu trabalho, obteve valores similares na produção de etanol quando analisou compostos aromáticos em diferentes culturas de iogurte.

Para Bills e Day (1966), a atividade da enzima álcool desidrogenase continua durante todo o período de estocagem, pois ocorre numa temperatura baixa em algumas bactérias do gênero *Streptococci*. Estes microrganismos são capazes de reduzir o acetaldeído, mas não reduzem a acetona. Zourari, Accolas e Desmazeaud (1992) citaram que esta enzima não tem sido encontrada em leites fermentados com *Lactobacillus bulgaricus*, mas tem sido muito presente em culturas com *Streptococcus thermophilus*. Todavia, Keenan e Lindsay (1967) reportaram a atividade desta enzima por algumas bactérias do gênero *Lactobacilli*.

#### 4.5 Relação cocos/bacilos

Quando os dois microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* são inoculados juntos, os estreptococos crescem primeiro, abaixam o pH até valores próximos a 5,5, quando então os lactobacilos iniciam seu crescimento. Os lactobacilos, quando presentes, desdobram parcialmente a caseína e lançam ao meio aminoácidos essenciais aos estreptococos, como valina e histidina. Os estreptococos ao multiplicarem também produzem substâncias que estimulam o crescimento dos lactobacilos. Dentre estas, destaca-se o ácido fórmico. Nesta fase, há um efeito simbiótico, ou seja, os microrganismos juntos crescem melhor do que se estivessem crescendo separadamente.

Os lactobacilos tendem a aumentar a acidez do meio e, como são mais resistentes a esta acidez, sobressaem-se em relação aos estreptococos, que são mais sensíveis.

Observa-se na Figura 22, que os lactobacilos só começaram a se desenvolver após 2 horas de incubação a 42° C, momento no qual o pH começou a abaixar, sendo que após 6 horas de incubação o desenvolvimento foi maior, quando o pH ainda estava ainda mais baixo (Figura 10). Segundo Ferreira (1993) logo após a inoculação, o *Streptococcus thermophilus* cresce primeiro, tendo a capacidade de desdobrar a lactose em pH mais neutro. Com o seu crescimento, o ácido láctico é acumulado, abaixando parcialmente o pH e lança algumas substâncias aminadas originadas das proteínas do soro que vão estimular o desenvolvimento do *Lactobacillus bulgaricus*.

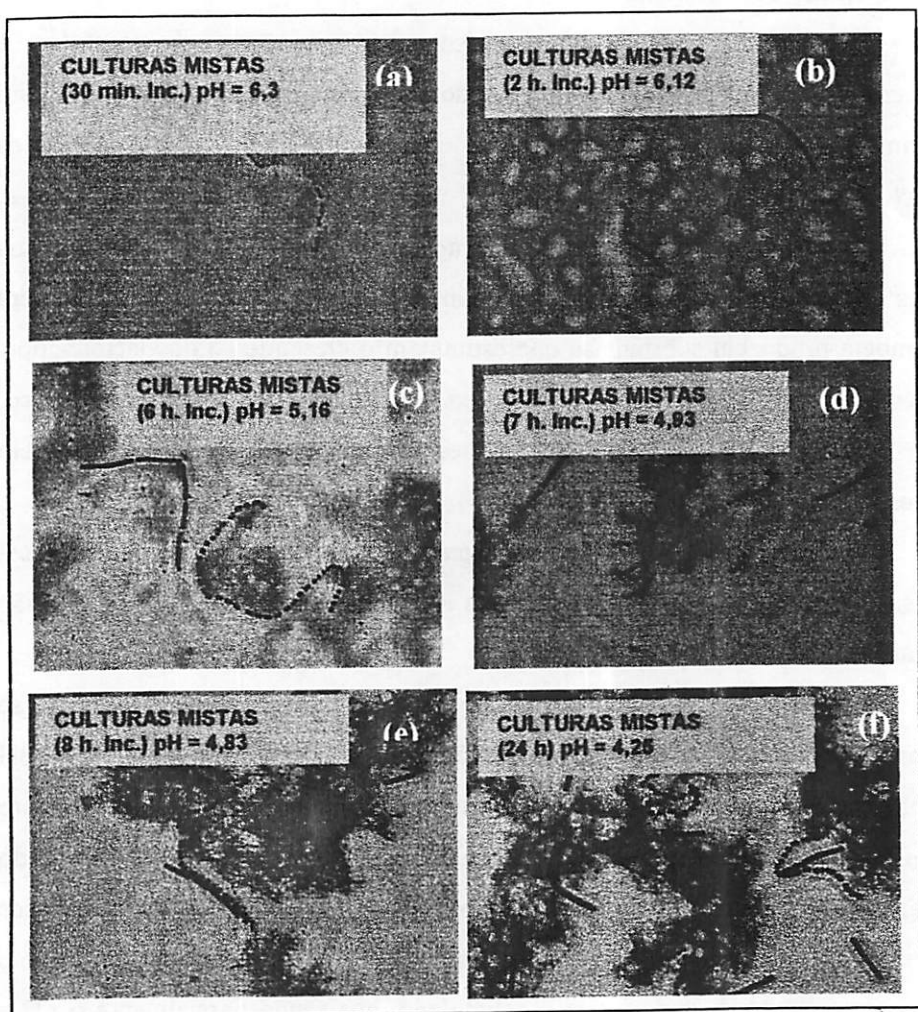


FIGURA 22 Representação fotográfica de lâminas de um iogurte elaborado com cultura mista (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*), mostrando a evolução no crescimento das bactérias durante o período de incubação, após coloração de gram (ampliação 1000 x).

No dia seguinte à fabricação, ou seja após 24 horas, observa-se que o número de estreptococos foi maior do que o de lactobacilos, sendo que a média conseguida em todos os campos (número de 10) foi de 4:1, e durante o período de armazenamento esta relação tendeu a se modificar, com aumento da proporção cocos:bacilos. Existe mais de uma explicação para este fato, uma delas é que na inoculação do leite, como foi inoculado 1 ml de cada fermento simples, a concentração de estreptococos pode ter sido maior do que a concentração de lactobacilos, pois se os dois tivessem apresentado a mesma concentração de células, os lactobacilos, como são mais resistentes à acidez estariam se sobressaindo em relação aos estreptococos, após mais ou menos quatro horas de incubação. Outra explicação poderia ser a contaminação por bacteriófagos do gênero lactobacilos, pois como já foi esclarecido, existe pouco estudo sobre os bacteriófagos que atacam este gênero, principalmente do *Lactobacillus bulgaricus*.

Em todos os iogurtes analisados, tanto os de mercado (Figura 23) como os fabricados com culturas comerciais (Figura 24), observou-se uma grande predominância de cocos nas lâminas durante todo o período experimental. A contagem foi realizada semanalmente, observando-se que quanto maior o tempo de estocagem, maior a predominância de cocos, sendo impossível estabelecer uma relação única entre cocos e bacilos.



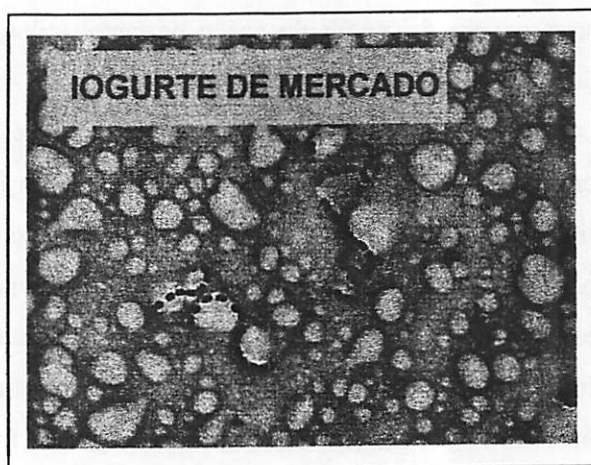


FIGURA 23. Representação fotográfica de uma lâmina de iogurte de mercado, após coloração de gram (ampliação 1000x).



FIGURA 24 Representação fotográfica de uma lâmina de iogurte elaborado com cultura comercial, após coloração de gram (ampliação 1000 x).



Uma explicação para isto, é que as próprias culturas comerciais são balanceadas numa proporção de 7:1, ou seja, para cada 7 colônias de estreptococos existe uma de lactobacilos, segundo informações do próprio fabricante do fermento.

Esta predominância de estreptococos nos iogurtes, tanto nos elaborados com culturas comerciais quanto naqueles de mercado, tem o propósito de aumentar a sua vida de prateleira, visto que quando predominam lactobacilos, o iogurte possui uma acidificação maior durante a estocagem comercial, diminuindo assim a sua vida útil. Esse desbalanceamento se faz necessário, em função da cadeia de transporte-comercialização não possuir, normalmente, um controle eficiente de temperatura. Dessa forma, os fermentos com alta relação cocos/bacilos, são utilizados para compensar essa deficiência, pois os estreptococos possuem uma baixíssima capacidade de pós-acidificação.

Segundo Schillinger (1999), para se promover um efeito terapêutico, um número mínimo de bactérias probióticas é necessário (cerca  $10^5$  a  $10^6$ /g). Porém, é importante que os lactobacilos remanescentes sejam viáveis durante a refrigeração e estocagem por diversas semanas, pois estes possuem propriedades probióticas destacadamente maiores que os estreptococos, os quais são insignificantes para essa propriedade. Diversos trabalhos (Auaud e Raya, 2001; Gonzales et al. 1994) indicaram que nem todos os produtos encontrados no mercado contêm microrganismos lácticos em altos números e muitos não mostraram boas características de sobrevivência, principalmente dos lactobacilos. Nos estudos de Schillinger (1999), todavia, a maioria dos leites fermentados estudados continham números marcadamente altos de bactérias lácticas, sendo inclusive maior que a quantidade mínima sugerida após a estocagem. Porém, em seu estudo o autor não encontrou *Lactobacillus bulgaricus*, mas um alto número em todos os iogurtes de *Streptococcus thermophilus* foi detectado. Uma explicação para a pouca quantidade de

lactobacilos pode ser a contaminação por bacteriófagos que, segundo Auad e Raya (2001), ocorre acidentalmente ou pela presença de bactérias lisogênicas as quais podem ser a maior fonte de fagos. Segundo Auad e Raya (2001) algumas cepas do gênero *Streptococcus* têm adquirido mecanismos de defesa a este ataque, entretanto, não existem informações documentadas sobre os bacteriófagos que atacam as bactérias do gênero lactobacilos, e em particular o *Lactobacillus bulgaricus*, sendo necessário mais estudos, pois estas espécies são de grande importância industrial, principalmente na fabricação de iogurtes e bebidas lácteas.

#### **4.6 Metodologia utilizada na extração, identificação e quantificação dos compostos voláteis através da cromatografia gasosa**

Após diversas tentativas de extração da amostra, tipo de frasco e septo, padrão interno, condições do cromatógrafo, tipo de seringa, etc., foi verificado que o método de extração através do "headspace" e as condições utilizadas no cromatógrafo neste experimento foram os melhores na identificação e quantificação dos picos avaliados.

A Figura 25 mostra os perfis cromatográficos de 7 amostras de iogurtes analisados.

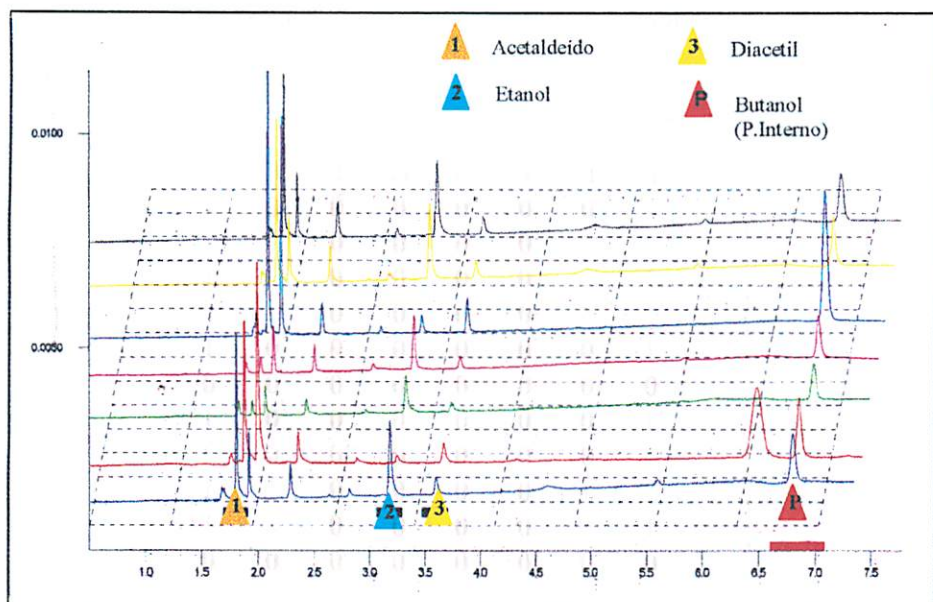


FIGURA 25. Perfis cromatográficos de 7 amostras de iogurtes analisados

Pode-se observar que, apesar dos picos serem relativamente pequenos, eles apresentam boa resolução, fornecendo assim resultados satisfatórios, condizentes com a literatura.

## 4.7 Análise sensorial

### 4.7.1 Teste do Limiar de detecção de diacetil:

O teste de limiar de detecção de diacetil apresentou os seguintes resultados (Quadro 4).

QUADRO 4 Resultados do teste de limites (amostras fornecidas aos julgadores em ordem crescente e decrescente de valores de concentração)

	→							←						
	A	B	C	D	E	F	G	G	F	E	D	C	B	A
01	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
02	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
03	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
04	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
05	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
06	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
07	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
08	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
09	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

Legenda: A = 0,0146 ppm, B = 0,0097 ppm, C = 0,0073 ppm,  
 D = 0,0048 ppm, E = 0,0036 ppm, F = 0,0024 ppm,  
 G = 0,0012 ppm

Nº 1 = Detecção

Nº 0 = Não detecção

Estes resultados foram resumidos (Quadro 5) e calculou-se o limiar de detecção observado por cada julgador através da média geométrica, obtendo-se assim, o limiar de detecção (ABNT, 1994).

QUADRO 5 Resultados do teste de limites e obtenção do limiar de detecção

Julgadores	Concentração (ppm)							Limiar (ppm)
	G (0,0012)	F (0,0024)	E (0,0036)	D (0,0048)	C (0,0073)	B (0,0097)	A (0,0146)	
01	0	0	0	1	1	1	1	0,0042
02	0	0	1	1	1	1	1	0,0030
03	0	0	1	1	1	1	1	0,0030
04	0	0	1	1	1	1	1	0,0030
05	0	0	0	1	1	1	1	0,0042
06	0	0	0	0	1	1	1	0,0060
07	0	0	0	1	1	1	1	0,0042
08	0	0	0	1	1	1	1	0,0042
09	0	0	0	1	1	1	1	0,0042
10	0	0	1	1	1	1	1	0,0030
11	0	0	1	1	1	1	1	0,0030
12	0	0	0	0	1	1	1	0,0060
<b>Limiar</b>								<b>0,0039</b>

O limiar de detecção verificado por cada julgador foi obtido pela média geométrica da concentração mais alta “não detectada” e a concentração seguinte. O limiar obtido do grupo foi a média geométrica dos limiares dos 12 indivíduos, cujo resultado foi de 0,0039 ppm.

Encontrou-se um limiar de detecção de 0,0039 ppm, abaixo do observado na literatura que varia de 8 a 0,005 ppm, sendo que o valor mais citado é de 0,01 ppm.

Segundo Groux (1973), o diacetil é um odorante muito potente, sendo que taxas entre traços até 0,01 ppm ou menos contribuem para o agradável e delicado “flavor” cremoso ou manteigoso.

Este baixo limiar de detecção encontrado, pode ser devido ao fato dos julgadores serem altamente treinados, além das diluições do composto terem sido realizadas em água destilada e deionizada, não havendo portanto nenhum

componente que pudesse mascarar o aroma do composto em estudo. Martineau, Acree e Henick-Kling (1995) estudaram o efeito do tipo de vinho na detecção da concentração mínima perceptível de diacetil (limiar) e mostraram que os diferentes tipos de vinho afetaram a percepção mínima do diacetil, encontrando resultados bem abaixo dos já verificados (0,005 ppm a 8 ppm). Essas diluições foram feitas em vinhos desacidificados com bicarbonato de sódio, o que pode descaracterizar um pouco o real aroma do vinho e consequentemente, do diacetil.

#### **4.7.2 Teste do limiar de detecção de acetaldeído**

Embora este composto seja considerado o mais importante componente presente no aroma do iogurte, não foi possível a realização deste teste, devido a informações obtidas na literatura no decorrer do experimento, as quais relataram ser esse composto altamente tóxico, quando inalado em baixíssimas concentrações (0,005 ppm), próximas do limiar de detecção, ou mesmo abaixo deste valor, podendo causar efeitos crônicos em seres humanos, como irritação da pele, dos olhos e do trato respiratório, eritemas, tosses, edema pulmonar e necrose, sendo que a inalação do produto, mesmo em concentrações baixas por um período prolongado, pode ocasionar inclusive tumores cancerígenos já relatados em experimentos com ratos. São claras as evidências da carcinogenicidade do acetaldeído em experimentos com animais (IARC, 1985). Através da inalação, o acetaldeído aumenta a incidência de células escamosas cancerígenas e adenocarcinomas na mucosa nasal de ratos de ambos os sexos e carcinomas laringeal em hamsters também de ambos os sexos. Estes estudos mostram que o risco que o acetaldeído promove está na sua inalação, pois quanto à ingestão do produto, ainda não existe na literatura trabalhos que comprovem algum tipo de risco para a saúde humana.

Trabalhos como o de Amoore e Hautala (1983), estimam que o limiar seja de  $0,09 \text{ mg/m}^3$  para o acetaldeído, ou seja  $0,07 \text{ ppm}$  ( $1 \text{ ppm}$  corresponde a  $1,8 \text{ mg/m}^3$ ), porém Stien et al. (1999), mostraram um limiar quase 10 vezes mais baixo ( $0,01 \text{ ppm}$ ) para este mesmo composto.

## 5 CONCLUSÕES.

- Tanto os iogurtes naturais obtidos no mercado quanto os elaborados com culturas comerciais, mostraram altas concentrações de acetaldeído e baixas concentrações de diacetil no mesmo tempo de armazenamento.
- Não houve produção de diacetil em iogurtes elaborados com culturas puras de *Lactobacillus bulgaricus*, mas ocorreu uma produção maior de diacetil em culturas puras de *Streptococcus thermophilus* do que quando a inoculação foi realizada com os dois microrganismos juntos.
- Em todos os iogurtes analisados, observou-se um desbalanceamento das culturas lácticas, predominando os estreptococos em relação aos lactobacilos.
- Houve produção de etanol durante a incubação e no período de estocagem em todas as amostras de iogurtes analisados, sendo que esta produção aumentou consideravelmente durante o tempo de armazenamento, até aproximadamente 21 dias.
- O limiar de detecção de diacetil encontrado foi de 0,0039 ppm.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Teste de sensibilidade em análise sensorial**. [S.l.: s.n.], 1994. (NBR 13172).
- ABREU, L.R. **Factors affecting the biosynthesis of branched-chain fatty acids in milk fat**. Madison: University of Wisconsin, 1993. 163p. (Doctorate thesis in Food Science).
- AMOORE, J.E.; HAUTALA, E. **Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution**. *Journal of Applied Toxicology*, Chichester, v.3, n.6, p. 272-290, 1983.
- AUAD, L.; RAYA, R.R. **Lactobacillus bajo la lupa**. *Énfasis Alimentación*, Buenos Aires, n.2, p. 68-70, 2001.
- BADINGS, H.T.; NETTER, R. **Recent advances in the study of aroma compounds of milk and dairy products**. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Amsterdam, v.34, n.9, p. 9-31, 1980.
- BILLS, D.D.; DAY, E.A. **Dehydrogenase activity of lactic streptococci**. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.49, p. 1473, 1966.
- BOTTAZI, V.; BATTISTOTTI, B.; MONTEGANI, G. **Influence des souches seules et associées de Lactobacillus bulgaricus et str. thermophilus ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans le yaourt**. *Lait*, Paris, v.53, p. 295-308, 1973.
- BOTTAZZI, V.; BATTISTOTTI, B.; VESCOVO, M. **Continuous production of yoghurt cultures and stimulation of lactobacillus bulgaricus by formic acid**. *Milchwissenschaft*, München, v.26, n.4, p. 214-219, 1971.
- BRANDÃO, S.C.C. **Determination of volatile flavor constituents and residual carbohydrates during the fermentation of yogurt**. Michigan: Michigan State University, 1980. 126p. (Doctorate thesis in Food Science).
- BUETTNER, A.; SCHIEBERLE, P. **Influence of mastication on the concentrations of aroma volatiles—some aspects of flavour release and flavour perception**. *Food Chemistry*, Oxford, v.71, p. 347-354, 2000.

CLAUS, D.A. A standardized gram staining procedure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.8, p. 451-452, 1992.

DAVIS, J.G. Modern yoghurt: manufacture and control. **Dairy and Ice Cream Field**, New York, p. 5-13, 1967.

DEETH, H.C.; TAMINE, A.Y. Yoghurt: nutritive and therapeutic aspects. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.44, n.1, p. 78-86. 1981.

DRASAR, F.S.; SHINER, M.R.; MACLEOD, G.M. Studies on the intestinal flora. I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. **Gastroenterology**, New York, v.56, n.1, p. 71-79, 1969.

DUMONT, J.P.; ADDA, J. Rapid method for highly volatile flavour compounds in dairy products: application to yoghurt. **Le Lait**, Paris, v.53, p. 12-22, 1973.

FERNANDEZ-GARCIA, E. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, p. 2934-2939, 1994.

FERREIRA, C.L. de L.F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 96p. (Boletim técnico).

FIX, G.J. **Diacetyl: formation, reduction and control**. [S.l.]: Brewing Techniques, 1993. Disponível em <<http://brewingtechniques.com/library/bakissues1.2/fix.html>>. Acesso em 20 set. 2001.

FRIEDRICH, J.E.; ACREE, J. Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v.8, n.4, p. 235-241, 1998.

GALLAGHER, C.R.; MOLLESON, A.L.; CALDWELL, J.H. **Carbohydrate: content of yogurt and effects of viable microflora upon digestion**. [S.l.]: Rutgers University, 1975. 89p.

GEORGALA, A.; TSAKALIDOU, E.; KANDARAKIS, I.; KALANTZOPOULOS, G. Flavour production in ewe's milk and ewe's milk yoghurt, by single strains and combinations of streptococcus thermophilus and lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, isolated from traditional greek yoghurt. **Lait**, Paris, v.75, p. 271-283, 1999.

GONZALEZ, S.; AMBROSINI, V.M. DE; NADRA, M.M. DE, HOLGADO, A.P. DE R.; OLIVER, G. Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.5, p. 436-440, 1994.

GROUX, M. Flavour components of yoghurt. **Le Lait, Société d'Assistance tech. Pour Produits Nestlé S.A.**, Lausanne, v.53, p. 146-153, 1973.

HAMDAM, I.Y.; KUNSMAN, J.E.; DEANE, D.D. Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.54, p. 1080, 1971.

HARPER, J.W.; HALL, C.W. **Dairy technology and engineering**. Westport: AVI, 1976. Não paginado.

HEILER, C.; SCHIEBERLE, P. Quantitative instrumental and sensory studies on aroma compounds contributing to a metallic flavour defect in buttermilk. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, p. 659-666, 1997.

IMHOF, R.; BOSSET, J.O. Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying standard addition method. **Technology Review**, Cambridge, v.27, p. 265-269, 1994.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human: allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides. **World Health Organization**, Geneva, v.36, 1985.

JANK, M.S.; GALAN, V.B. Competitividade do sistema agroindustrial do leite. 2001. Disponível em <<http://www.foodnet.com.br/ABIQ>>. Acesso em 20 set. 2001.

JORDAN, K.N.; COGAN, T.M. Production of acetolactate by *Lactococcus diacetilactis* and *leuconostoc* spp. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.55, p. 227, 1988.

KANG, Y.J.; FRANK, J.F.; LILARD, D.A. Gas chromatographic detection of yogurt flavor compounds and changes during refrigerated storage. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v.23, p. 6-10, 1988.

KEENAN, T.W.; BILLS, DD. Metabolism of volatile compounds by lactic starter culture microorganisms: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, p. 1561-1567, 1968.

KEENAN, T.W.; LINDSAY, R.C. Dehydrogenase activity of lactobacillus species. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.50, p. 1585, 1967.

KELLY, L.L. Lactose intolerance: could yogurt be the answer? **Cultured Dairy Production Journal**, Washington, v.19, p. 12-14, 1984.

KENEIFEL, W.; KAUFMANN, M.; FLEISCHER, A.; ULBERTH, F. Screening of commercially available mesophilic dairy starter cultures: biochemical, sensory and microbiological properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.48, p. 783, 1992.

KILARA, A.; SHAHANI, K.M.  $\beta$ -galactosidase activity of cultured and acidified dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.57, p. 592, 1976.

KROGER, M. Arguments for yogurt with viable bacteria. **Cultured Dairy Production Journal**, Washington, v.45, n.2, p. 607-612, 1978.

LAYE, I.; KARLESKIND, D.; MORR, C.V. Chemical, microbiological and sensory properties of plain non fat yogurt. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.5, p. 991-995, 1993.

LERAYER, A.L.S.; BROLAZO, E.; TALEB, O. Buttermilk: uma alternativa para o setor de leites fermentados e bebidas lácticas. **Indústria de Laticínios**, Belo Horizonte, v.5, n.31, jan./fev. 2001.

LINDSAY, R.C.; KEENAN, T.W.; DAY, E.A. Acetaldehyde production and utilization by lactic starter organisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.48, p. 783, 1965.

MARRANZANI, R.M.; SCHMIDT, R.H.; SHIREMAN, R.B.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A. Effect of threonine and glycine concentrations on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in a modified milk prepared by ultra filtration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, p. 1142-1148, 1989.

MARTINEAU, B.; ACREE, T.E.; HENICK-KLING, T. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. **Food Research International**, Essex, v.28, n.2, p. 139-143, 1995.

MOCQUOT, G.; HUREL, C. The selection and use of some microorganisms for the manufacture of fermented and acidified milk products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v.23, n.3, p. 130-143, 1970.

MONNET, C.; SCHMITT, P.; DIVIES, C. Method for assaying volatile compounds by headspace gas chromatography and application to growing starter cultures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p. 1809-1815, 1994.

OTT, A.; FAY, L.B.; CHAINTREAU, A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, n.3, p. 850-857, 1997.

OTT, A.; HUGRI, A.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Sensory investigation of yogurt flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.48, p. 441-450, 2000.

RAND, A.G. The use of enzymes for the reduction of lactose levels in milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.28, p. 68, 1976.

RASIÉ, J.L.J.; KURMANN, J.A. **Yoghurt: scientific grounds, technology, manufacture and preparations**. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978. 464p.

RODRIGUES, F.C. **Guia prático para elaboração de iogurte e bebida láctea: curso básico para iniciantes**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, 1998. 50p.

SALADO, G.A. **Viabilidade de implantação e sobrevivência de lactobacilos no trato intestinal de humanos adultos**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 92p. (Dissertação - Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.47, p. 79-87, 1999.

**SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS.** Federação da Agricultura do Estado de Minas Gerais. **Diagnóstico da indústria de laticínios do estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte, 1996. 102p. (Relatório de Pesquisa).

**SEMMELOCH, P.; GROSCH, W.** Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatographic: olfactometry of headspace samples. **Technology Review, Cambridge**, v.28, n.3, p. 310-313, 1994.

**SPECK, M.L.** Evidence of value of live starter culture in yogurt. **Cultured Dairy Products Journal, Washington**, v.18, n.1, p. 25-26, 1983.

**STIEN, G.; BLANCHARD, F.; RONDAGS, E.; MARC, I.** Une méthode de dosage en ligne du diacétyle et de l'acétaldehyde dans les yaourts, laits fermentés, beurres et margarines. **Lait, Paris**, v.79, p. 615-624, 1999.

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

**THORNHILL, P.J.; COGAN, T.M.** Use of gas liquid chromatography to determine the end products of growth of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, v.47, p. 1250, 1984.

**TRAMER, J.** Yogurt cultures. **Journal of the Society of Dairy Technology, London**, v.26, n.5, p. 16-20, 1973.

**ULBERTH, F.** Headspace gas chromatographic estimation of some yogurt volatiles. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry, Arlington**, v.74, p. 630, 1991.

**ULBERTH, F.; KNEIFEL, W.** Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt related products. II. Classification of starters cultures by means of cluster analysis. **Milchwissenschaft, München**, v.47, n.7, p. 432-434, 1992.

**VARNAN, A.H.; SUTHERLAND, J.P.** Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1994. 476p.

**VERINGA, H.A.** Biochemistry of yogurt. **Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Medelingen**. n.7, p. 88-96, 1973.

VERINGA, H.A.; VERBUG, E.H.; STAHOUDERS, J. Determination of diacetyl in dairy products containing  $\alpha$ -acetolactic acid. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.38, p. 251, 1984.

WILKINS, D.W.; SCHMIDT, R.H.; KENNEDY, L.B. Threonine aldolase activity in yogurt bacteria as determined by headspace gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, p. 150-152, 1986.

ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria: a review. **Lait, Paris**, v.72, p. 1-34, 1992.

11

