

Avaliação da qualidade de iogurtes naturais durante diferentes tempos de armazenamento

Kênia Borges de Oliveira ^[1], Juliana Aparecida Célia ^[2], Diene Gonçalves Souza ^[3], Jéssica Silva Medeiros ^[4], Edmar Soares Nicolau ^[5], Marco Antônio Pereira da Silva ^[6]

[1] keniaborges_2008@hotmail.com. [2] juliana.rv@hotmail.com. [3] diene_gsouza@hotmail.com. [4] jessicasilva.medeiros.sm@gmail.com. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. [5] rena@cpa.evz.ufg.br. Universidade Federal de Goiás – Campus II. [6] marco.antonio@ifgoiano.edu.br. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito do armazenamento do leite durante 0, 24, 48 e 72 horas, analisando a qualidade dos iogurtes naturais durante o 1º, 8º, 15º, 22º e 29º dia de estocagem. Examinou-se, no leite cru refrigerado, a acidez titulável, o pH, a viscosidade, o rendimento e o crescimento de microrganismos psicotróficos. Nos iogurtes produzidos, avaliou-se a cinética de fermentação, o pH, a acidez titulável, a viscosidade, o crescimento de microrganismos psicotróficos e a viabilidade de bactérias lácticas durante o armazenamento. Foram realizadas ainda as análises de proteínas, lipídeos, cinzas, matéria seca e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. O leite cru refrigerado apresentou baixa acidez para todos os tempos de refrigeração e pH acima de 6,8. A acidez titulável e o pH foram inversamente proporcionais; o iogurte produzido com o leite de 24 horas de estocagem apresentou maior teor de acidez durante o período de armazenamento e menor pH a partir do 22º até o 29º dia de armazenamento. As bactérias lácticas apresentaram redução durante os 29 dias de armazenamento, mas foram superiores a 10^7 UFC/mL. Na composição centesimal do iogurte, a matéria seca variou de 11,28 a 12,90%, as cinzas de 0,78 a 0,85%, a proteína de 3,33 a 3,47% e a gordura de 3,32 a 4,50%; os valores encontrados estão de acordo com a legislação.

Palavras-chave: Bactérias psicotróficas. Refrigeração. Probiótico.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of milk storage during 0, 24, 48 and 72 hours, analyzing the quality of natural yoghurt during the 1st, 8th, 15th, 22nd and 29th days of storage. Chilled raw milk, titratable acidity, pH, viscosity, yield and growth of psychrotrophic microorganisms were analyzed. In the yoghurt produced, fermentation kinetics, pH, titratable acidity, viscosity, growth of psychrotrophic microorganisms and viability of lactic acid bacteria were evaluated. For storage, protein, lipid, ash, dry matter and infrared absorption spectroscopy analyzes were performed. Chilled raw milk showed low acidity for all cooling times and pH above 6.8. The titratable acidity and pH were inversely proportional, the yoghurt produced with 24-hour storage milk was higher during the storage period and the lowest pH from the 22nd to the 29th day of storage. Lactic bacteria decreased during 29 days of storage, but were higher than 10^7 CFU / mL. In the proximate composition of yoghurt the dry matter ranged from 11.28 to 12.90%, ashes from 0.78 to 0.85%, protein 3.33 to 3.47% and fat 3.32 to 4.50%. The values found are in accordance with the legislation

Keywords: *Psychrotrophic Bacteria. Refrigeration. Probiotic.*

1 Introdução

O leite é altamente nutritivo e importante na dieta humana, porém, um excelente meio de cultura para os microrganismos (ZENI *et al.*, 2013). É praticamente impossível a obtenção de leite livre de microrganismos contaminantes, sendo assim, definem-se os números aceitáveis destes, com base nas alterações que esses números causam no leite e derivados (BRITO; BRITO, 2001).

Alguns fatores podem influenciar na taxa de contaminação microbiana do leite, sendo estes: o estado de saúde e higiene das vacas leiteiras, a higiene do ambiente onde as vacas estão alojadas e são ordenhadas, os métodos de preparação do úbere, as técnicas de ordenha, a metodologia utilizada para a limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha, assim como do tanque de leite, a higiene dos trabalhadores e o binômio tempo/temperatura (CEMPIRKOVA, 2007).

A contagem bacteriana total (CBT), a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem de bactérias psicrotróficas interferem na qualidade do produto, pois estas dizem respeito aos padrões microbiológicos do leite (MENDES *et al.*, 2014).

A temperatura de armazenagem do leite é um fator de suma importância para a taxa de crescimento bacteriano. De acordo com a temperatura de crescimento, os microrganismos responsáveis pela contaminação do leite podem ser classificados em três classes principais: mesófilos, psicrotróficos e termodúricos. Portanto, a qualidade do leite está associada à carga microbiana presente no produto (SANTOS; FONSECA, 2001).

Associar refrigeração, boas práticas de obtenção e manipulação pode evitar ou refrear a contaminação inicial do leite por microrganismos psicrotróficos (SANTOS *et al.*, 2013). Porém, a refrigeração do leite cru, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer a sua qualidade (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). No momento do processamento, esses microrganismos têm influência significativa na vida útil, na qualidade sensorial, na deterioração e no rendimento dos derivados lácteos (SAMARZIJA; ZAMBERLIN; POGAČIĆ, 2012).

Nesse contexto, objetivou-se, nesta pesquisa, avaliar a qualidade do leite cru refrigerado nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de armazenagem, quanto a acidez titulável, o pH, o crescimento de bactérias psicrotróficas e o rendimento de massa, além do

desenvolvimento de iogurte, determinando suas características físico-químicas e o crescimento de bactérias psicrotróficas e de bactérias ácido lácticas nestes.

2 Referencial teórico

Alguns dos fatores que podem influenciar na qualidade do leite são: a velocidade do resfriamento, a agitação e o tempo de armazenagem. O leite refrigerado por longos períodos pode sofrer dissociação do complexo das caseínas, diminuição do tamanho das micelas e solubilização do cálcio. Isso, por sua vez, pode gerar dificuldades no processo de coagulação do leite e na fabricação de queijos, formando, conseqüentemente, uma camada espessa de grumos de gordura no leite e gerando alterações no sabor e odor pela ação das lipases naturais (REIS; DE SANTANA; ROIG, 2015).

Os métodos de conservação são fundamentais para diminuir, ou até mesmo eliminar, os microrganismos deterioradores do leite, proporcionando melhor qualidade nutricional ao produto, maior vida de prateleira e maior segurança alimentar aos consumidores (MENEZES *et al.*, 2014).

A refrigeração do leite reduz os custos operacionais de produção, incluindo aqueles relacionados a sua deterioração por atividade acidificante de bactérias mesofílicas, podendo ocasionar problemas tecnológicos associados à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias psicrotróficas (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). Devido a esses fatores, há grande necessidade de associar a refrigeração com as boas práticas de obtenção e manipulação, para evitar ou monitorar a contaminação inicial do leite por microrganismos psicrotróficos (SANTOS *et al.*, 2013).

A qualidade do leite é um dos maiores problemas da cadeia do leite no Brasil, interferindo negativamente na produção e no rendimento de derivados (SANTOS; FONSECA, 2007). A Instrução Normativa nº 62 de 2011 (BRASIL, 2011) determina padrões de qualidade no estabelecimento industrial quanto a estrutura física, equipamentos e utensílios de ordenha, definindo medidas de higienização das instalações, de armazenamento e de transporte; estabelece critérios para o controle da sanidade do rebanho; impõe condições higiênico-sanitárias; e especifica procedimentos e requisitos físico-químicos e microbiológicos para a obtenção de matéria-prima de qualidade. Ainda de acordo com Instrução Normativa 62/2011, o leite considerado normal deve apresentar

teor de gordura mínimo de 3 g/100g, acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g ácido/100mL, densidade relativa a 15°C entre 1,028 g/mL e 1,033 g/mL, extrato seco desengordurado mínimo de 8,4 g/100g, índice crioscópico entre -0,512°C e -0,531°C e valor mínimo de proteína de 2,9 g/100g. Para que o leite cru seja considerado de boa qualidade, este deve apresentar baixa carga bacteriana, ausência de microrganismos patogênicos, reduzida contagem de células somáticas e ausência de resíduos de substâncias químicas (SANTOS; FONSECA, 2007). A estocagem refrigerada do leite cru por longos períodos de tempo afeta negativamente a qualidade do leite e de derivados em decorrência do desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos. A deficiência na cadeia de frios no Brasil tem sido responsável pela redução do tempo de vida útil do leite pasteurizado e sua consequente deterioração (LORENZETTI, 2006).

3 Método da pesquisa

Realizou-se esta pesquisa durante os meses de maio a junho de 2015. Foram coletadas 4 amostras, com três repetições cada, de leite cru refrigerado no Setor de Bovinocultura de Leite do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

O leite utilizado no experimento foi o da primeira ordenha após a lavagem do tanque de armazenamento. Foram coletados 24 litros de leite a 2°C, sendo transportado para o Laboratório de Produtos de Origem Animal do IF Goiano em recipiente de plástico, previamente sanitizado.

As amostras de leite foram acondicionadas em diferentes recipientes, cada um com 6 litros de leite, constituindo os tempos de sua estocagem – 0, 24, 48 e 72 horas. O leite de tempo 0 foi imediatamente submetido às análises e à produção de iogurte natural. Para as análises foram utilizados 1,5 litro de leite e para a produção do iogurte foram utilizados 4,5 litros, compostos de três repetições. Em cada repetição, utilizava-se 1,5 litro de leite. As demais amostras de leite foram armazenadas sob refrigeração à temperatura de 4°C ±1°C para posterior processamento nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Em todos os casos, foram avaliados a qualidade do leite, o processamento e a avaliação da qualidade dos iogurtes, conforme os respectivos tempos de armazenamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz

(2005), titulando-se 10 mL da amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1M e fenolftaleína 1% como indicador.

O pH do leite foi aferido com o uso de potenciômetro digital de bancada – modelo W38 (Bel Engineering®).

A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro rotativo microprocessado Quimis® modelo Q860M26. As amostras foram posicionadas na altura indicada do espíndole, com velocidade de 50 rotações por minuto. O tempo mínimo de leitura foi de aproximadamente 5 minutos por amostra.

Para avaliação do crescimento bacteriano total, alíquotas de 25 mL da amostra de leite foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10⁻¹). A partir desta diluição, foram realizadas diluições decimais das amostras até 10⁻⁶. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para placa contendo ágar padrão para contagem (PCA). O plaqueamento foi em “spread plate”, ou seja, em superfície; a amostra foi espalhada com alça de Drigalski e incubada a 7° C por 10 dias (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

Para avaliação do rendimento em massa, o leite foi acidificado a um pH de 5,7, a partir da adição de solução de ácido cítrico a 10% e posterior adição de 40 µL de cloreto de cálcio. Este valor de pH foi escolhido para simular a produção de queijos com pré-maturação lática, como descrito em Vasconcelos, Araújo e Verruma-Bernardi. (2004).

O leite refrigerado destinado à produção dos iogurtes naturais foi filtrado para eliminação de qualquer sujidade, homogeneizado e submetido a tratamento térmico à temperatura de 90°C durante 3 minutos, seguido de resfriamento para 42°C. Logo após, adicionou-se o inóculo contendo *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*, na proporção de 0,1%. Os iogurtes foram envasados, em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar sob luz ultravioleta, em embalagens de polipropileno de 250 mL, previamente identificadas, e incubados em estufa (BOD Quimis® modelo Q-315d) à temperatura de 42°C. Iniciou-se o monitoramento da fermentação experimental até atingir pH ±4,5. As medições foram realizadas com intervalos de 30 minutos cada. Após a fermentação, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração à temperatura de 4°C ±1°C.

Os iogurtes naturais foram analisados no 1°, 8°, 15°, 22° e 29° dia de armazenamento.

Tanto a acidez titulável quanto o pH foram determinados utilizando a metodologia aplicada nas

amostras de leite, sendo estas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro rotativo microprocessado Quimis® modelo Q860M26, utilizando a metodologia anteriormente descrita nas análises do leite usado para a fabricação do iogurte.

Para a verificação da atividade de bactérias lácticas durante o período de 29 dias de armazenamento, diluiu-se uma alíquota de 25 mL da amostra em 225 mL de água peptonada 0,1%; a partir desta, foram realizadas diluições decimais das amostras até 10^{-7} . Uma alíquota de 1 mL foi transferida para o fundo da placa de petri; em seguida, adicionou-se o meio M.R.S. Agar (KASVI®). O plaqueamento foi "pourplate", realizado em triplicata, com incubação a 35°C por 48 horas, e assim feitas as contagens das bactérias lácticas viáveis (UFC/mL).

Aos 8 dias de estocagem das amostras de iogurte, avaliou-se o teor de matéria seca, cinzas, proteína e gordura.

Obteve-se o teor de matéria seca através do aquecimento da amostra em estufa a 105°C durante 16 horas, atingindo peso constante, conforme técnica descrita pelo método oficial nº 925.10 da AOAC International (1997).

As amostras resultantes da análise de matéria seca foram aproveitadas para cinzas. Realizou-se a carbonização total da matéria orgânica em mufla (Bravac, M2) a 550°C, por cerca de 10 horas, obtendo-se cinzas claras, como descrito no método oficial nº 923.03 da AOAC International (1997).

Para a análise de proteína bruta, determinou-se o nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, segundo o método oficial nº 960.52 da AOAC International (1997). O nitrogênio total foi convertido em proteína bruta utilizando-se o fator de conversão 5,95 (ALENCAR; ALVARENGA, 1991). Os equipamentos utilizados foram: bloco digestor (Tecnal, TE-0070) e destilador de nitrogênio (Tecnal, TE-0363).

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, segundo Instituto Adolfo Lutz (2005).

As análises de infravermelho foram realizadas na Central Analítica, no Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, através de espectrômetro Frontier Perkin Elmer com varredura de 650 a 4500 cm^{-1} . Coletou-se uma amostra de cada tratamento, cerca de 0,5 g, colocando-a no leitor do aparelho.

Os valores médios de acidez titulável, pH, viscosidade, contagem de psicotróficos do leite,

viabilidade de bactérias lácticas e cinética da fermentação dos iogurtes foram apresentados por meio de regressão com uso do Software Excel versão 2007.

A influência do tempo de estocagem na qualidade do leite, no rendimento de fabricação e na composição físico-química dos iogurtes foi comparada por meio do teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do Software Sisvar (FERREIRA, 2010).

4 Resultados da pesquisa

Os valores da acidez titulável (Figura 1 A) do leite cru refrigerado foram decrescentes durante o período de estocagem (0, 24, 48 e 72 horas); no tempo de 48 para 72 horas, este decréscimo mostrou-se mais acentuado. A acidez titulável do leite cru refrigerado apresentou-se em desacordo com a preconizada pela legislação vigente, que estabelece 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2011). Isso pode ser atribuído a vários fatores como: leite proveniente de vacas com mamite, adição de substância alcalina, estado nutricional do rebanho ou presença de água. Mendes *et al.* (2010) ao avaliarem a acidez em leite refrigerado, descreveram que 6,20%, em 32 amostras, estavam fora do padrão para essa análise, em Mossoró-RN. Mendonça *et al.* (2009), no teste de acidez pelo método de Dornic, observaram que 20% das amostras de leite cru estavam abaixo de 14°D.

Com relação ao pH, houve aumento em função do tempo de estocagem, variando de 6,8 a 7,1; do tempo 0 ao tempo de 24 horas este aumento foi mais acentuado. Santos e Fonseca (2007) atribuíram a faixa de pH de 6,6 a 6,8 como normal para leite bovino. No entanto, valores superiores a 6,8 indicam mastite.

A viscosidade (Figura 1 C) do leite cru refrigerado apresentou-se crescente durante os períodos de estocagem, sendo que, no período de 48 para 72 horas, o crescimento foi mais acentuado, quando comparado com os demais períodos. Este fato relaciona-se com o crescimento de microrganismos psicotróficos, no mesmo período. Shirai e Masson (2010), em estudo com leite cru refrigerado durante o armazenamento, afirmaram que a alteração da viscosidade pode estar correlacionada com o aumento de microrganismos psicotróficos. O aumento da viscosidade é decorrente da atividade de enzimas extracelulares e termorresistentes, particularmente proteases, produzidas por bactérias psicotróficas

contaminantes do leite antes do processamento térmico (SHIRAI; MASSON, 2010).

A contagem dos microrganismos psicotróficos (Figura 1 D) apresentou-se crescente até as 72 horas de estocagem. Nos períodos que se estenderam de 0 a 48 horas, o crescimento médio de bactérias psicotróficas foi de $1,9 \log_{10}$ UFC/mL no tempo 0 hora, após 24 horas de estocagem, $5,2 \log_{10}$ UFC/mL, e após 48 horas de estocagem, $5,5 \log_{10}$ UFC/mL.

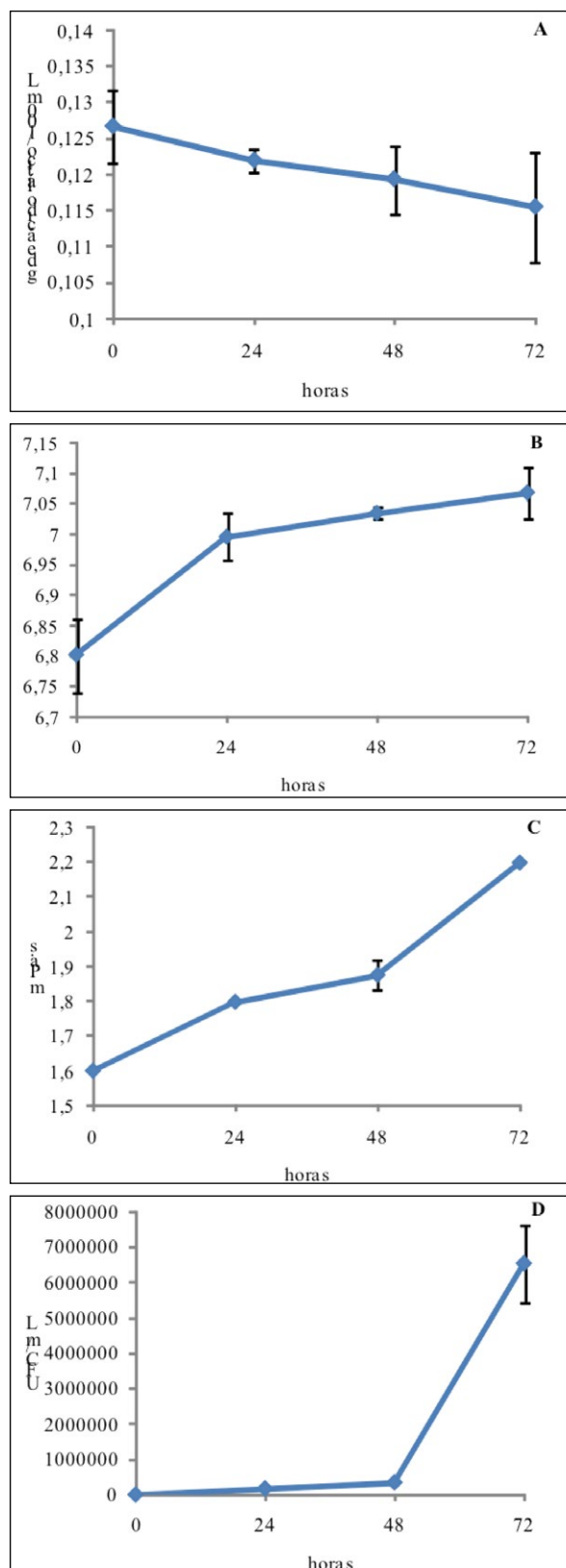
A contagem de psicotróficos no leite durante os períodos de 0 a 48 horas foi de 10^5 UFC/mL. Conforme Gaucher *et al.* (2008) e Hantsis-Zacharov e Halpern (2007), este resultado não interferiria na sua qualidade, pois ambos relataram que o limite máximo de psicotróficos no leite cru é de até 10^6 UFC/mL, enquanto para Cempírkova e Mikulová (2009), o limite considerado seguro é de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

Santos *et al.* (2013), estudando o crescimento de microrganismos psicotróficos em leite cru refrigerado, constataram aumento crescente da contagem desse grupo de microrganismos à medida que aumentou-se o tempo de armazenamento, correlacionando-se com o presente estudo, que constatou, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de estocagem a 4°C , valores de 0,06, 0,11 e 0,74 \log UFC/mL, respectivamente. Izidoro *et al.* (2009), estudando a influência do resfriamento marginal sobre a multiplicação de microrganismos psicotróficos nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas de estocagem, registraram média de $3,8 \log$ UFC/mL, no tempo 0, e $5,5 \log$ UFC/mL no tempo de 48 horas.

Verificou-se que, na transição dos períodos de 48 a 72 horas de estocagem, a contagem de bactérias psicotróficas apresentou aumento acentuado quando comparada aos demais períodos, com valores médios de $5,5$ a $6,8 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente, mostrando que o número de bactérias estava acima de 6.000.000 por mL. Segundo Zeni *et al.* (2013), quando o número exceder a 5 milhões/mL, há um considerável risco de alterações das proteínas e da gordura do leite.

Este resultado evidencia a necessidade de um controle mais rigoroso com relação ao tempo de estocagem do leite na propriedade rural, pois, se o leite for submetido a períodos de estocagem sob refrigeração, como o encontrado neste estudo, o controle de microrganismos psicotróficos prevenirá problemas tecnológicos e econômicos, além de apresentar elevada importância para a qualidade microbiológica final da matéria-prima (RECHE *et al.*, 2007).

Figura 1 – Acidez titulável (A), pH (B), viscosidade (C) e contagem de psicotróficos do leite refrigerado até 72 horas



Fonte: Elaborada pelos autores

O rendimento de massa do leite (Tabela 1) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$); o maior rendimento foi constatado no tempo 0 de estocagem, quando apresentou o menor crescimento de microrganismos psicrotóxicos. De acordo com Lawrence (1991), a estocagem do leite pode indiretamente influenciar no rendimento de queijos, dependendo da população inicial de microrganismos psicrotóxicos, da temperatura e do período de estocagem.

Tabela 1 – Valores médios do rendimento em massa do leite refrigerado até 72 horas

Tratamentos	Rendimento
0 hora	26,88 ± 6,55a
24 horas	23,72 ± 1,04b
48 horas	23,71 ± 0,94b
72 horas	23,64 ± 0,99b
CV(%)	13,81

Fonte: Elaborada pelos autores

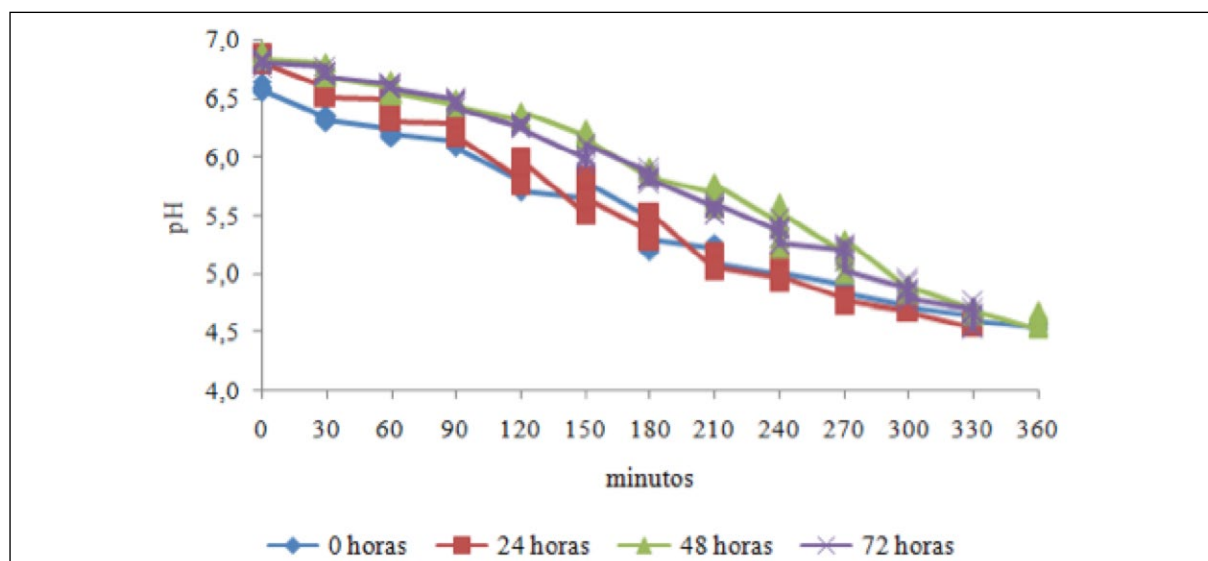
*Letra minúscula na coluna difere entre si mediante teste de Tukey a 5,0% de probabilidade.

A Figura 2 apresenta a evolução dos valores de pH durante o período de incubação, sendo possível observar que o tempo de incubação para atingir pH 4,5 foi maior para os iogurtes produzidos com o leite de 0 e 48 horas de estocagem – ambos fermentaram em

360 minutos –, enquanto para os iogurtes produzidos com o leite de 24 e 72 horas, a fermentação ocorreu em 330 minutos. Oliveira e Damin (2003) verificaram o tempo de fermentação de 330 a 750 minutos. Frighetto *et al.* (2011), na cinética de fermentação de iogurte, relataram tempo de fermentação de 240 a 270 minutos. Silva *et al.* (2012), avaliando o comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção do iogurte natural, observaram que a fermentação atingiu pH 4,75 no tempo de 720 minutos. Esses resultados condizem com o alcançado no presente estudo.

A acidez titulável do iogurte, durante o período de 29 dias de armazenamento, apresentou-se crescente (Figura 3 A), sendo que, no iogurte produzido com o leite de 24 horas de estocagem, foi maior durante todo o período de armazenamento, seguido pelo iogurte produzido com o leite de 48 horas. O iogurte produzido com o leite de 72 horas apresentou sua acidez crescente até o 15º dia de armazenamento; a partir daí ocorreu decréscimo até o 22º dia, apresentando novamente um crescimento acentuado do 22º ao 29º dia de armazenamento. A acidez do iogurte produzido com o leite de 0 hora apresentou-se crescente até o 22º dia; a partir daí, houve um pequeno decréscimo da acidez titulável. As mudanças na acidez do produto ocorrem em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas, e também se relacionam às mudanças nos valores de pH (LIMA, 2011).

Figura 2 – Cinética da fermentação de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas



Fonte: Elaborada pelos autores

O pH decresceu durante o período de 29 dias de armazenamento (Figura 3 B), sendo inversamente proporcional à acidez titulável. O iogurte produzido com o leite de 72 horas apresentou maior pH no 8º, 22º e 29º dia de armazenamento, enquanto o iogurte produzido com o leite de 48 horas apresentou menor pH no 15º dia; já o iogurte produzido com o leite de 24 horas apresentou menor pH no 22º e 29º dia de armazenamento. O decréscimo do pH durante o período de armazenamento está relacionado com a degradação da lactose. Os microrganismos adicionados ao leite transformam parte da lactose em ácido láctico. Devido ao meio ácido, as proteínas coagulam e o iogurte começa a adquirir textura característica (TAMINE; ROBINSON, 1991).

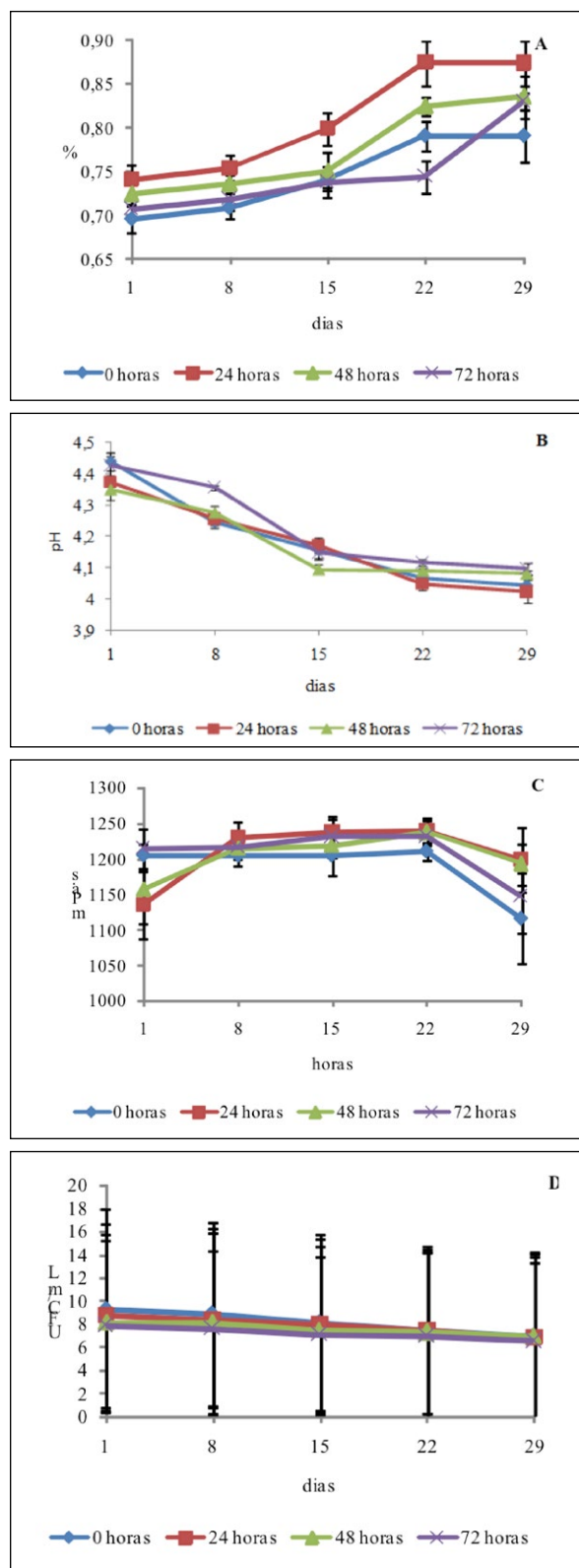
Os resultados de acidez titulável variaram de 0,70 g/100g a 0,87 g/100g e estão de acordo com os preconizados pela legislação que estabelece 0,6 a 1,5 g de ácido láctico/100g; o pH apresentou variação de 4,02 a 4,44. Pimentel, Garcia e Prudencio (2012) relataram valores de acidez titulável de 1,09 g/100g a 1,27 g/100g e pH de 4,16 a 4,45, durante 28 dias de armazenamento do iogurte.

A viscosidade (Figura 3 C) avaliada a 50 rpm apresentou variação durante o período de armazenamento. O iogurte produzido com o leite de tempo 0 apresentou uma estabilização da viscosidade do 1º ao 22º dia de armazenamento, com decréscimo do 22º ao 29º dia, além de apresentar menor viscosidade a partir do 8º dia. O iogurte produzido com o leite de 24 horas apresentou crescimento acentuado da viscosidade do 1º ao 8º, seguido por uma estabilização do 8º ao 22º dia e um decréscimo do 22º ao 29º dia, sendo que a viscosidade do 8º ao 29º dia de estocagem foi a maior entre os tratamentos.

O iogurte produzido com o leite de 48 horas apresentou crescimento da viscosidade do 1º ao 22º dia, no entanto, do 1º ao 8º dia, o crescimento foi mais acentuado, com decréscimo do 22º ao 29º dia de armazenamento. No iogurte produzido com o leite de 72 horas houve estabilização do 1º ao 8º dia, porém a viscosidade foi crescente do 8º ao 15º dia, seguido novamente por uma estabilização do 15º ao 22º dia e, por fim, um decréscimo do 22º ao 29º dia.

Estes resultados corroboraram os de Silva *et al.* (2012) ao avaliarem o comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção do iogurte natural. No entanto, foram divergentes dos relatados por Cunha Neto *et al.* (2005) em estudo com iogurte natural que verificou viscosidade crescente até o 30º dia de armazenamento.

Figura 3 – Acidez titulável (A), pH (B), viscosidade (C) e bactérias lácticas viáveis (D) de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas



Fonte: Elaborada pelos autores

Os iogurtes apresentaram viabilidade de bactérias lácticas (Figura 3 D) durante todo o período de 29 dias de estocagem; apesar da diminuição nas contagens, a viabilidade da cultura probiótica se manteve superior a 10^7 UFC/mL, estando em conformidade com o estipulado pela legislação, que determina que os microrganismos dos cultivos utilizados devem ser viáveis, ativos e estar em concentrações iguais ou superiores a 10^7 UFC/g no produto final e durante o prazo de validade (BRASIL, 2007). Os resultados correlacionam-se com os de Gallina (2010) em leites fermentados e com os de Perez *et al.* (2007) em iogurte com adição de biomassa de *Spirulina platensis*. A realização da análise de contagem de microrganismos psicrotróficos no iogurte teve como objetivo a comprovação da eficiência do tratamento térmico de 90°C durante 3 minutos, que apresentou ser eficaz, pois não foi constatada presença de microrganismos psicrotróficos nos iogurtes produzidos com o leite de 0, 24, 48 e 72 horas de estocagem.

Os valores de matéria seca, cinzas, proteína e gordura estão apresentados na Tabela 2. Os resultados da matéria seca e cinzas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$); os teores de proteína não diferiram entre si ($p > 0,05$); a gordura, no entanto, variou significativamente ($p < 0,05$) no iogurte produzido com o leite estocado por 72 horas.

O resultado da matéria seca do iogurte natural foi menor que os valores relatados por Mantovani *et al.* (2012), que variaram de 20,1 g/100g a 29,9 g/100g em iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais.

Os teores de cinzas, proteína e gordura do presente estudo foram semelhantes aos verificados por Mantovani *et al.* (2012): 0,46 g/100g a 0,9 g/100g, 3,14 g/100g a 5,89 g/100g e 3,0 g/100g a 4,0 g/100g, respectivamente.

Gerhardt *et al.* (2013), em bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado, verificaram valores de gordura menores do que os do presente estudo, variando de 2,90 g/100g a 3,10 g/100g, e valores de cinza e proteína semelhantes: 0,88 g/100g a 1,06 g/100g e 2,99 g/100g a 4,44 g/100g, respectivamente.

Os resultados de cinzas, proteína e gordura foram maiores que os relatados por Oliveira *et al.* (2014), em iogurtes produzidos com tapioca – cinzas de 0,36 g/100g a 0,63g/100g, proteína de 1,94 g/100g a 2,92 g/100g e gordura de 1,61 g/100g a 3,13 g/100g –, e que os encontrados por Costa *et al.* (2013), em estudo com bebida láctea fermentada elaborada com diferentes espessantes – cinzas de 0,52g/100g a 0,62g/100g, proteína de 2,21g/100g a 2,58g/100g e gordura de 1,47g/100g a 1,63g/100g.

Tabela 2 – Valores médios de matéria seca (g/100g), cinzas (g/100g), proteína (g/100g) e gordura (g/100g) dos iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas

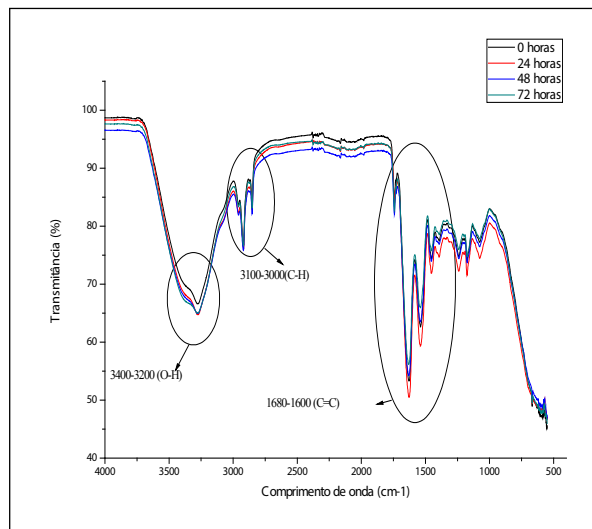
Tempo	Parâmetros			
	Matéria Seca	Cinzas	Proteína	Gordura
0 hora	11,28±0,13d	0,82±0,11b	3,47±0,04a	4,42±0,20a
24 horas	12,90±0,13a	0,85±0,16a	3,33±0,25a	4,41±0,21a
48 horas	12,34±0,11b	0,81±0,14c	3,38±0,17a	4,50±0,07a
72 horas	11,74±0,08c	3,41±0,17a	3,41±0,17a	3,32±0,10b
CV(%)	0,95	0,15	5,18	3,92

Fonte: Elaborada pelos autores

*Letra minúscula na coluna difere entre si mediante teste de Tukey a 5,0% de probabilidade.

Na avaliação do infravermelho (Figura 4), observou-se que existem grupos polares, tais como OH e -H, possivelmente devido ao teor elevado de carboidratos e proteínas (macromoléculas) presentes no iogurte.

Figura 4 – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas



Fonte: Elaborado pelos autores.

5 Conclusão/Considerações

A avaliação da qualidade do leite cru estocado por longos períodos apresentou acidez titulável fora do padrão estabelecido pela legislação. Fatores como leite proveniente de vacas com mamite, adição de substância alcalina, estado nutricional do rebanho ou a presença de água podem ter influenciado tanto na acidez como no pH. Esse resultado também pode ser explicado pelas condições de obtenção do leite cru.

A viscosidade do leite está diretamente ligada à contagem de bactérias psicrótróficas, pois ambas apresentaram valores crescentes, demonstrando que quanto maior a viscosidade, maior a contagem de psicrótróficos no leite. Estas bactérias também influenciaram no rendimento de massa do leite, cujos resultados foram melhores no leite estocado por zero hora.

No iogurte, a cinética da fermentação apresentou menores valores para os produzidos com o leite estocado por 24 e 72 horas e maiores valores para os produzidos com o leite armazenado por 0 e 48 horas. A acidez titulável, as bactérias lácticas, a matéria seca,

as cinzas e os teores de gordura e proteína ficaram dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira.

Os resultados obtidos no estudo servem para fornecer informações de alerta aos produtores bem como órgãos de fiscalização sobre o fato de que o leite estocado por longos períodos na indústria de laticínios pode oferecer prejuízos econômicos e de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, M. L. C. B. B.; ALVARENGA, M. G. Farelo de arroz: composição química e seu potencial como alimento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 34, n. 1, p. 95-108, 1991. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000074&pid=S0101-2061200900010003400003&lng=en. Acesso em: 13 ago. 2019.
- AOAC INTERNATIONAL - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011**. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, DF: MAPA, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007**. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, anexo à presente Instrução Normativa. Brasília, DF: MAPA, 2007.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F. H.; DE MATOS, L. L.; HOLANDA JR., E. V. (org.). **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 61- 74.
- CEMPIRKOVA, R. Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in re-lation to selected factors. **Czech Journal of Animal Science**, v. 52, n. 11, p. 387- 393, 2007. Disponível em: <https://81.0.228.28/publicFiles/00444.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2019.
- CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech J AnimSci**, v. 54, n. 2, p. 65-73, 2009. Disponível em: <https://81.0.228.28/publicFiles/03997.pdf>. Acesso em: 06 ago. 2019.

COSTA, A. V. S.; NICOLAU, E. S.; TORRES, M. C. L.; FERNANDES, P. R.; ROSA, S. I. R.; NASCIMENTO, R. C. Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 34, p. 209-226, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p209. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744119016>. Acesso em: 29 jul. 2019.

CUNHA NETO, O. C. da; OLIVEIRA, C. A. F. de; HOTTA, R. M.; FRANZOLIN NETO, R. Estudo da qualidade do iogurte natural batido produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 448-453, 2005.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FRIGHETTO, J. M.; SILVA, S. V. da; PELLEGRINI, L. G.; MILANI, M. P.; ROBERTO, B. S.; RICHARDS, N. S. P. S. Influência da adição de beta-galactosidase nas características físico-químicas do leite e na cinética de fermentação de iogurte. **Indústria de Laticínios**, v. 90, p. 90-93, 2011.

GALLINA, D. A. Leites fermentados funcionais. **Indústria de Laticínios**, v. 86, p. 30-36, 2010.

GAUCHER, I.; MOLLÉ, D.; GAGNAIRE, V.; GAUCHERON, F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 130-143, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X07001014>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GERHARDT, Â.; MONTEIRO, B. W.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 68, n. 390, p. 41-50, jan./fev. 2013. DOI: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130007>. Disponível em: <https://revistadoilct.com.br/rilct/article/view/7>. Acesso em: 13 jun. 2019.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7162-7168, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00866-07. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/73/22/7162.short>. Acesso em: 23 jun. 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2005.

IZIDORO, T. B.; SPINA, T. L. B.; TUASEK, S. O.; PEREIRA, J. G.; BARROS, V. R. M.; PINTO, J. P. A. N. Influência do resfriamento marginal sobre a multiplicação de microrganismos psicotróficos e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 64, n. 371, p. 55-60, nov./dez. 2009. Disponível em: <https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/107>. Acesso em: 09 ago. 2019.

LAWRENCE, R. C. Processing Conditions. In: MANN, A. R. (ed.). **Special Issue no. 9301: Factors affecting the yield of cheese**. Brussels: International Dairy Federation: 1991. Cap. 7.

LIMA, C. M. F. Monitoramento de temperaturas de equipamentos de refrigeração em supermercados da cidade de Maceió – AL. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 194/195, p. 35-39, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0101-2061201900020041000015&lng=en. Acesso em: 11 jun. 2019

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos no leite cru de dois estados da Região Sul**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006.

MANTOVANI, D.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; COSTA, S. C. Elaboração de iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais, análise físico-química e perfil da textura. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, p. 680-687, 2012. DOI: 10.389/S1981-3686201200010007. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Lucio_Filho/publication/272923434_ELABORACAO_DE_IOGURTE_COM_DIFERENTES_CONCENTRACOES_DE_SOLIDOS_TOTAIS_ANALISE_FISICO-QUIMICA_E_PERFIL_DA_TEXTURA/links/582c320108ae102f0720bd5d/ELABORACAO-DE-IOGURTE-COM-DIFERENTES-CONCENTRACOES-DE-SOLIDOS-TOTAIS-ANALISE-FISICO-QUIMICA-E-PERFIL-DA-TEXTURA.pdf. Acesso em: 09 jul. 2019.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A. da; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró-RN. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, 2010. DOI: 10.526/cab.v11i2.1146. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Sidnei_Sakamoto/publication/44796900_

ANALISES_FISICO-QUIMICAS_E_PESQUISA_DE_FRAUDE_NO_LEITE_INFORMAL_COMERCIALIZADO_NO_MUNICIPIO_DE_MOSSORO_RN/links/5722024708aee491cb32c2f4/ANALISES-FISICO-QUIMICAS-E-PESQUISA-DE-FRAUDE-NO-LEITE-INFORMAL-COMERCIALIZADO-NO-MUNICIPIO-DE-MOSSORO-RN.pdf. Acesso em: 14 jun. 2019

MENDES, E. A. S.; PIRES, C. V.; SILVA, A. M.; SILVA, L. S. Qualidade do leite cru refrigerado em função do tipo de ordenha coletado de produtores do município de Paracatu-MG. **Zootecnia**, v. 1, n. 2, p. 63-71, 2014.

MENDONÇA, M. B. O. C.; CURIKIB, Y.; JULIANIC, G.; DE SANTANA, E. H. W.; ALEGROE, L. C. A. Qualidade Físico-Química de Amostras de Leite Cru Comercializadas Informalmente no Norte do Paraná. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 11, n. 4, p. 47-50, 2009. DOI: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2009v11n4p%25p>. Disponível em: <https://revista.pgsskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/1434>. Acesso em: 28 jul. 2019.

MENEZES, M. F. S. C.; SIMEONI, C. P.; BORTOLUZZI, D.; HUERTA, K.; ETCHEPARE, M.; MENEZES, C. Microbiota e conservação de leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 76-89, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revista/article/view/13033>. Acesso em: 14 ago. 2019.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; FIGUEIREDO, R. M. F.; FEITOSA, R. M. Development and characterization of yogurts produced with tapioca. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, p. 110-120, 2014.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 172-176, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000400032>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612003000400032&script=sci_arttext. Acesso em: 22 jun. 2019.

PEREZ, K. J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa da microalga *Spirulina platensis* durante o armazenamento refrigerado. **Alim. Nutr. Araraquara**, v. 18, n. 1, p. 77-82, jan./mar. 2007. Disponível em: <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/137>. Acesso em: 12 ago. 2019.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Iogurte probiótico com frutanos tipo inulina de diferentes graus de polimerização: características físico-químicas e microbiológicas e estabilidade ao armazenamento. **Semina. Ciências Agrárias (Impresso)**, v. 33, p. 1059-1070, 2012. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n3p1059. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744113017.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2019.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas/proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 26, n. 3, p. 645-651, jul.-set. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300025>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000300025&script=sci_arttext. Acesso em: 06 ago. 2019.

RECHE, N. L. M.; NETO, A. T.; D'OLIVEIRA, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole; 2007.

REIS, K. T. M. G.; DE SANTANA, E. H. W.; ROIG, S. M. Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: Revisão. **Journal of Health Sciences**, v. 15, p. 411-421, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2013v0n0p%25p>. Disponível em: <https://revista.pgsskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/591>. Acesso em: 09 jul. 2019.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, Š.; POGAČIĆ, T. Bactérias psicrotóxicas e seus efeitos negativos na qualidade do leite e produtos lácteos. **Coletânea de Jurisprudência: Comissão de Assuntos Jurídicos e Empresariais**, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SANTOS, A. S.; PIRES, C. V.; SANTOS, J. M.; COSTA SOBRINHO, P. S. Crescimento de microorganismos psicrotóxicos em leite cru refrigerado. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 3, p. 297-300, jul./set. 2013. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/299>. Acesso em: 12 jun. 2019.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. **Higiene alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001199507>. Acesso em: 13 ago. 2019.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2007. 314 p.

SHIRAI, M.; MASSON, M. L. Metodologia de Superfície de Resposta para avaliar o efeito da carbonatação sobre a microbiota e viscosidade do leite cru. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, p. 18-27, 2010. Disponível em: <https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/131>. Acesso em: 07 jun. 2019.

SILVA, A. R.; MORO, L. M. E.; PINTO, E. G.; SOUZA, A. F.; FRANCO, B. Estudo do comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção de iogurte natural. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1908-1913, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciência y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

VASCONCELOS, M. P.; ARAÚJO, K. G. L.; VERRUMBERNARDI, M. R. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. **R. bras. Agrociência**, v. 10, n. 4, p. 499-502, 2004. DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.18539/CAST.V10I4.1032](http://dx.doi.org/10.18539/CAST.V10I4.1032). Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/1032>. Acesso em: 07 jul .2019.

ZENI, M. P.; MARAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. Influência dos microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência - ACET**, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61-70 jan./jun. 2013. Disponível em: <https://unoesc.emnuvens.com.br/acet/article/view/2111>. Acesso em: 11 jun. 2019.