



Vida de prateleira de iogurte de cajá com *Bacillus clausii*: avaliação química, físico-química e microbiológica

Cashew yogurt shelf life with *Bacillus clausii*: chemical, physicochemical and microbiological evaluation

¹Gabriel Dantas Ramos, ²Silmara Louise dos Santos Dias, ³Igor Macedo Ferreira, ⁴Ana Mara Oliveira e Silva, ⁵Michelle Garcêz de Carvalho

Resumo: O iogurte é uma bebida fermentada a qual pode-se adicionar culturas de bactérias probióticas e polpas de frutas tornando-o mais atrativos para os consumidores. Objetivou-se elaborar duas formulações de iogurte de cajá (F1: com *Bacillus clausii*; F2: sem *Bacillus clausii*), e avaliar suas características químicas (composição centesimal, atividade do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e fenólicos totais), físico-químicas (pH e sólidos solúveis totais - SST) e microbiológicas (coliformes totais e termotolerantes, *Estafilococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., fungos e viabilidade de *B. clausii*) ao longo de 150 dias de estocagem. O iogurte de cajá apresentou um baixo teor lipídico (2,63g lipídeo/100g de iogurte), sendo parcialmente desnatado e fonte de proteína (8,3g proteína/100g de iogurte). O *B. clausii* exerceu pouca influência no DPPH, FRAP e fenólicos totais ao longo da estocagem, mas influenciou o pH, deixando o iogurte de cajá menos ácido a partir do dia 60 em comparação com a F2. Os SST variaram (22,33 a 27) ao longo da estocagem, sendo diferentes entre as formulações nos dias 30 e 150, com maiores médias no iogurte de cajá com *B. clausii*. Houve apenas crescimento de fungos ao longo da estocagem. Já o *B. clausii* permaneceu viável ao longo dos 150 dias de estocagem, com contagem final de $4,1 \times 10^8$ UFC/g de iogurte de cajá. As características apresentadas pelo iogurte, fazem dele um produto atrativo ao público, em especial ao que busca por alimentos com propriedades funcionais e com reduzido teor de gordura, além de ser um meio propício para o probiótico *B. clausii*.

Palavras-chave: *Bacillus clausii*; atividade antioxidante; viabilidade; iogurte; cajá.

Abstract: Yogurt is a fermented drink that one can add probiotics and fruit pulps making it more attractive to consumers. The objective of this study was to elaborate two formulations of yellow mombin yogurt (F1: with *Bacillus clausii*; F2: without *Bacillus clausii*), and evaluating its chemical characteristics (centesimal composition, radical activity 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and total phenolics), physicochemical (pH and soluble solids content) and microbiological quality (total and thermotolerant coliforms, coagulase-positive *Staphylococcus* count, *Salmonella* sp. evaluation, fungi count and viability of *B. clausii*) over 150 days of storage. The yellow mombin yogurt presented a low-fat content (2.63g lipid/100g of yogurt), and a protein source (8.3g protein/100g). The *B. clausii* exerted little influence on DPPH, FRAP and total phenolics throughout storage, but influenced pH, leaving the yogurt less acidic after 60 days compared to F2. For soluble solids outcome, it ranged (22.33 to 27) throughout storage, being different between formulations on days 30 and 150, with higher averages in yellow mombin yogurt with *B. clausii*. There was only growth of fungi along storage. The probiotic *B. clausii* remained viable over the 150 days of storage, with a final count of 4.1×10^8 CFU/g. The characteristics presented by the yogurt make it an attractive product to the public, especially those looking for foods with functional properties and with low-fat content, besides being a propitious carrier for probiotic *B. clausii*.

Keywords: probiotic, spores, viability, antioxidant activity.

*Autor correspondente: E.Mail: michellegarcezpi@hotmail.com

Recebido em 10.12.2019. Aceito em 30.12.2019

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20190033>

¹Discente do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão, SE, Brasil, CEP: 49100-000. Telefone: (79) 3194-7498. E-mail: gabrieldantasramos@gmail.com

²Discente do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão, SE, Brasil, CEP: 49100-000. Telefone: (79) 3194-7498. E-mail: silmaralouisee@gmail.com

³Técnico do laboratório de microbiologia de alimentos do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Sergipe, Campus São Cristóvão, SE, Brasil, CEP: 49100-000. Telefone: (79) 3194-7498. E-mail: engigormacedo@gmail.com

⁴Doutora em Ciência de Alimentos, Professora do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Nutrição, Campus São Cristóvão, SE, Brasil, CEP: 49100-000. Telefone: (79) 3194-7498. E-mail: anamarauufs@gmail.com

^{5*}Doutora em Ciência de Alimentos, Professora do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Nutrição, Campus São Cristóvão, SE, Brasil, CEP: 49100-000. Telefone: (79) 3194-7498. E-mail:

1. Introdução

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo, e junto com os seus derivados representam a principal fonte de cálcio e proteína na alimentação da população brasileira (CAPITANI et al., 2014). Entre os derivados lácteos tem-se o iogurte um tipo de leite fermentado cujo processo de fermentação é realizado por microrganismos protosimbióticos específicos, o *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Além disso, pode ser acompanhado de outras bactérias ácido lácticas ou acrescidos de substâncias alimentícias, com limitação de até 30% de ingredientes não lácteos em relação ao peso total do produto (BRASIL, 2007).

O iogurte é fonte de cálcio, ácido fólico, vitaminas A, do complexo B e sais minerais (BISCAIA et al., 2004; RAMESH, 2006). Durante sua fermentação há hidrólise parcial de

proteínas, gorduras e lactose, facilitando sua digestão e aumentando a biodisponibilidade para o consumidor, característica benéfica até aos indivíduos com menor tolerância à lactose (RODAS et al. 2001). Este tipo de produto ainda permite adição de polpas de frutas e probióticos (THAMER; PENNA, 2006; REIS et al., 2009), como iogurtes com polpa de acerola (SCHMIDT et al., 2012), iogurtes com polpa de cajá (GONÇALVES et al., 2018), assim como iogurte com probióticos (SILVA, 2007), sendo classificados como alimentos funcionais, cujo mercado apresenta crescimento anual de 15 a 20% (CAPITANI et al., 2014).

A adição de frutas ao iogurte está associada a valorização da qualidade sensorial e ampliação do consumo de frutas regionais (REIS et al., 2009; SCHMIDT et al., 2012; FERREIRA et al., 2015), já o uso de probióticos está vinculado ao aumento dos benefícios à

saúde (SILVA, 2007). Entre as frutas comercializadas no Brasil, podemos destacar o cajá (*Spondias mombin* L.) pertencente à família *Anacardíceae*, possui caráter regional, sendo bastante consumida no Norte e Nordeste, e apresenta boa característica para a industrialização, em termos de rendimento e sabor. Seu fruto amarelado e de sabor agridoce é extremamente aromático e rico em vitaminas A e C, carotenoides e taninos, traz significativo apelo funcional com provável característica antioxidante natural (MATTIETTO et al., 2010; SOARES et al., 2006). A partir do cajá são elaborados vários produtos alimentícios como polpa pasteurizada congelada (MATA et al., 2005), geleias, compotas, refrescos, iogurte e sorvetes (SILVA et al., 2013; GOLÇALVES et al., 2018).

Espécies do gênero *Bacillus* tem sido usado como probiótico, com destaque para o *Bacillus clausii* devido sua capacidade de esporulação, o que lhe confere maior resistência às enzimas digestivas durante o trânsito intestinal (HOA et al., 2000). O *Bacillus clausii* é uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos, aeróbios estritos e catalase positivo (FULLER, 1989). É capaz de sobreviver ao ambiente estomacal e colonizar o intestino mesmo na presença de antibióticos (DUC et al., 2004).

Há comprovação clínica de efeito *Bacillus clausii* na diminuição significativa da diarreia (SOROKULOVA, 2013).

A formulação de um novo produto requer o conhecimento de suas características (BELLARDE, 2006). Diante disso, observa-se que o consumo de iogurte tem aumentado consideravelmente devido a mudança de hábito da população que busca alimentos mais saudáveis (MAZOCHI et al., 2010), sendo então interessante que em sua composição haja presença da cajá (GOLÇALVES et al., 2018), uma fruta que além de acrescentar sabor regional, fornece compostos bioativos com atividade antioxidante (CARVALHO et al., 2011). Sendo assim, objetivou-se elaborar formulações de iogurte de cajá, com e sem *Bacillus clausii*, e avaliar sua composição centesimal, características químicas, físico-químicas e microbiológicas ao longo de 150 dias de estocagem sob refrigeração.

2. Materiais e métodos

2.1. Elaboração do iogurte de cajá

Para a elaboração do iogurte foram utilizados os seguintes ingredientes: leite integral UHT (Betânia[®]), leite em pó do tipo desnatado (Lasserenisssima[®]), fermento lácteo (Rica Nata[®]). Para a elaboração do iogurte foram utilizados os seguintes ingredientes: polpa pasteurizada de cajá (Pomar[®]) e açúcar cristal

(Estrela[®]), na proporção 8:2 m/m. Na fermento láctico termofílico e homofermentativo, de acidificação rápida, constituído das culturas lácticas (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) (GOLÇALVES et al., 2018). A elaboração do iogurte foi conforme o protocolo descrito por Gonçalves et al. (2018). Foram preparadas duas formulações de iogurte de cajá que se diferenciaram pela adição ou não de *Bacillus clausii*, sendo a “Formulação 1 (F1)” adicionada de *Bacillus clausii* ativado (10mL/50g) e “Formulação 2 (F2)” sem adição de *Bacillus clausii*, as quais foram mantidas sob refrigeração a 5±2°C em geladeira (GE SMART FRESH 410, BRASIL) e avaliadas nos dias 1, 30, 60 e 150.

2.2. Composição centesimal, valor calórico, avaliação físico-química e química do iogurte

O estudo da composição centesimal incluiu a determinação dos teores de umidade (secagem em estufa a 105°C), proteínas (micro *Kjeldahl*), lipídios totais (método de Bligh-Dyer) e cinzas (queima em mufla a 550°C). Todas as análises foram realizadas em triplicata (BRASIL, 2008). Além disso, através de cálculos de diferença, foram determinados os carboidratos totais (CT: 100 - (umidade + cinzas+ proteínas + lipídios)), sendo

fermentação do iogurte foi utilizado um todos os valores expressos em g/100g. O valor calórico total foi estimado conforme os valores de conversão de Atwater, através dos seguintes fatores de conversão: 4kcal/g para proteínas e carboidratos e 9kcal/g para os lipídios (DAMIANI et al., 2009). Para avaliações físico-químicas e químicas, foram adotados os seguintes parâmetros analíticos, em triplicata, nos dias 1, 30, 60 e 150 de estocagem: pH, com auxílio de um potenciômetro (Jenway, 3505, Inglaterra) (BRASIL, 2008); sólidos solúveis totais (SST), com auxílio de refratômetro, sendo expressos em °Brix (BRASIL, 2008); fenólicos totais por meio do método Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959); DPPH (% de varredura do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil) de acordo com a metodologia de Brand-Williams et al. (1995); e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) de acordo com a metodologia de BENZIE & STRAIN (1996).

2.4. Avaliação microbiológica

As formulações de iogurte de cajá (Formulação 1 e Formulação 2) foram avaliados microbiologicamente no que se referem aos fungos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Estafilococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella sp.* Os fungos e *Estafilococcus* coagulase positiva são expressos em unidades formadoras de colônias (UFC)/g

de iogurte, os coliformes totais e mais provável (NMP)/g de iogurte, enquanto que a *Salmonella sp.* é expressa em ausência ou presença em 25g de iogurte (SILVA et al., 2010). Os padrões microbiológicos foram verificados com base na RDC nº 12 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) e de acordo com a instrução normativa nº 46 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece os padrões de identidade e qualidade de leites fermentados (BRASIL, 2007).

2.5. Viabilidade do *Bacillus clausii* em iogurte

A análise tem como principal finalidade encontrar nas amostras de iogurte avaliadas a contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) do *Bacillus clausii*/g, dentro da faixa de 10^8 a 10^9 , especificada pela legislação brasileira para que seja considerado um iogurte com propriedade funcional probiótica (BRASIL, 1999).

2.5.1. Ativação do *Bacillus clausii*

Os esporos do *B. clausii* foram adquiridos comercialmente em farmácia sob a forma de flaconetes (Enterogermina®), contendo segundo informações do fabricante, 10^9 UFC de esporos do microrganismo por unidade de flaconete (5mL). A ativação do *B. clausii* foi realizada em meio Brain Heart Infusion

termotolerantes são expressos em número (BHI) na proporção 1:1 v/v, por 24h a 37°C em banho-maria (SOUZA, 2017).

2.5.2. Preparação da amostra e diluição seriada

Após a ativação do *B. clausii* adicionou-se 10mL do mesmo em cada 50g da formulação 1. Da amostra inoculada com *B. clausii* retirou-se 25g a qual foi diluída em 225mL de solução salina a 0,9% obtendo-se a diluição 10^{-1} , posteriormente seguiu-se com o preparo das diluições até a diluição 10^{-7} (SILVA et al., 2010).

2.5.3. Inoculação e incubação

Posteriormente foram feitos os plaqueamentos em triplicata para cada amostra. As placas com ágar Mueller Hinton (MH) (30mL), receberam 0,5mL da amostra diluída e feito o espalhamento na placa (plaqueamento superficial) com auxílio da alça de Drigalski até o meio de cultura ter absorvido todo o conteúdo da amostra. Foram incubadas as placas invertidas, em estufa a 31°C/48 horas em atmosfera normal (sem remoção de oxigênio) (SILVA et al., 2010; SOUZA, 2017).

2.5.4. Confirmação das colônias e cálculo dos resultados

Contaram-se todas as placas e as com 25 a 250 colônias foram selecionadas para cálculo do número de UFC/g ou mL,

em função do número de colônias, volume da diluição e diluição inoculada. Foram submetidas ao teste de catalase e coloração Gram (SILVA et al., 2010).

2.6. Análise estatística

Os dados experimentais foram apresentados como médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Quando apropriado, a comparação de médias entre os dois iogurtes, no mesmo dia de análise, foi realizada por teste t-Student não pareado. Comparações múltiplas de médias (ANOVA unifatorial seguida do teste de Tukey) foi empregada para avaliar o efeito do tempo de refrigeração (1 a 150 dias) nas propriedades físico-químicas e químicas dos iogurtes. Para isso, a homocedasticidade de todo o conjunto de dados foi formalmente atestada pelo teste de Brown-Forsythe usando o *software* Statistica v. 13.3 (Statsoft, Tulsa, EUA). Valores de probabilidade (p-valor) abaixo de 0,05 foram considerados significativos nas análises inferenciais.

3. Resultados e discussão

3.1. Composição centesimal e valor calórico do iogurte com *Bacillus clausii*

Na Tabela 1, está disposta a composição centesimal e o valor calórico do iogurte de cajá com *B. clausii*. Verificou-se que o iogurte de cajá com *B. clausii* apresentou maior teor de umidade (70,88%), seguido dos carboidratos totais (16,71g/100g de iogurte), proteína

separadas de cada placa 3 colônias típicas de *B. clausii*. As colônias obtidas foram (8,3g/100g de iogurte), lipídios (2,63g/100g de iogurte), cinzas (1,48g/100g de iogurte) e o valor calórico equivalente a 123,71Kcal/100g de iogurte (Tabela 1).

De acordo com a ingestão diária recomendada de proteína para adultos (50g) (BRASIL, 2005), cada 100g de iogurte de cajá supriria 16,6% desse nutriente. Com base nos valores de referência da TACO para iogurte (TACO, 2011), constata-se que apenas o teor lipídico foi o que mais se aproximou com o iogurte de cajá (Tabela 1). Essa variabilidade pode estar associada às etapas de processamento do iogurte de cajá, entre elas a adição de geleia de cajá em vez da adição de polpa de cajá e diferença de ingredientes usados na elaboração do iogurte (GOLÇALVES et al., 2018).

Os padrões de identidade e qualidade de leites fermentados determina que o iogurte deve possuir um teor proteico mínimo de 2,9g/100g de iogurte, além disso, classifica os leites fermentados quanto ao teor lipídico/100g com creme (mínimo 6g gordura), integral (mínimo 3g gordura), parcialmente desnatado (máximo de 2,9g gordura) e desnatado (máximo 0,5 g gordura) (BRASIL, 2007). Diante disso, o iogurte de cajá atende ao que é

preconizado pela legislação quanto ao teor proteico e lipídico, sendo classificado como parcialmente desnatado (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal do iogurte de cajá com *Bacillus clausii*. 2019.

Composição centesimal	Formulação do iogurte*	TACO (2011) [#]
Umidade	70,88±0,09	84,6
Cinzas	1,48±0,01	0,6
Lipídios	2,63±0,07	2,3
Proteínas	8,3±0,3	2,7
Carboidratos totais	16,71±0	9,7
Energia	123,71±0	70

*Média e desvio padrão. Umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos totais: são expressos em (%): g/100g; Energia: expressa em kcal/100g de amostra. [#]Tabela brasileira de composição de alimentos (Valores de referência).

O iogurte de cajá proposto (Tabela 1) é considerado um alimento com baixo teor de gordura (máximo 3g gordura total/100g) e fonte de proteína (mínimo 6g de proteína/100g) de acordo com o regulamento técnico sobre informação nutricional complementar (BRASIL, 2012), podendo então ter essas atribuições no seu rótulo em caso de comercialização.

3.2. Avaliação físico-química e química do iogurte com e sem *Bacillus clausii*

Na Tabela 2, encontra-se a estabilidade físico-química e química das formulações de iogurte de cajá (com *Bacillus clausii* - F1 e sem *Bacillus clausii* - F2) ao longo de 150 dias de estocagem. Observa-se que houve variação significativa ($p < 0,05$) entre as formulações

de iogurte em todas as características avaliadas, indicando que a adição do *B. clausii* pode ter influenciado esses resultados. No que se refere ao pH, na formulação 1 foi menor (4,94 a 4,97) e na formulação 2 foi maior (5,10 a 5,20) nos dias 1 e 30, sendo o oposto observado nos dias 60 e 150 de estocagem (Tabela 2). O pH tem influência direta com a quantidade de ácido presente no alimento (BRASIL, 2008), sendo a pós-acidificação um processo comum em lácteos fermentados, onde as bactérias presentes continuam a fermentar e geram como subproduto ácidos que podem condicionar a microbiota probiótica do produto (ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004). Os resultados de pH demonstram que o *B.*

clausii (F1) exerceu influência no pH, deixando o iogurte de cajá menos ácido a partir dos 60 dias de estocagem (Tabela 2).

O prolongamento do tempo de estocagem favorece a redução do pH do produto (GIESE et al. 2010), fato confirmado formulação 2 (de 5,2 para 4,15) (Tabela 2). A faixa de pH (4,15 a 5,20) das formulações do iogurte de cajá (Tabela 2) foi próxima a de iogurte com frutas já comercializados, os quais apresentam em média pH de 3,9 a 4,5 características sensoriais e a sobrevida do probiótico (RIBEIRO, 2011). Os sólidos solúveis totais variaram (22,33 a 27) entre as formulações de iogurte de cajá, diferenciando-se ($p<0,05$) entre as formulações nos dias 30 e 150, sendo as maiores médias observadas na formulação 1 (Tabela 2).

Os sólidos solúveis totais (SST), indicam a quantidade de sólidos suspensos na água (BRASIL, 2008), a adição de polpa de frutas, açúcar e leite em pó aumentam os sólidos solúveis totais e permite maior conteúdo proteico, além de sabor mais adocicado (GRANDI; ROSSI, 2010). Esse teste é utilizado principalmente para avaliar maturação de frutas, mas é importante também para a indústria láctea por afetar diretamente no rendimento dos produtos, assim como sua aparência, consistência e aceitação, sendo comum iogurtes comercializados com

(GIESE et al., 2010; BORGES et al., 2009). O pH abaixo de 4,5 confere ao iogurte sabor ácido, o que pode provocar rejeição por parte dos consumidores (BORGES et al., 2009).

Os produtos com probióticos favorecem a proteólise da caseína, que serve como substrato beneficiando as bifidobactérias (ALMEIDA et al., 2001), além disso, a presença de probióticos em leite fermentado pode ocasionar o aumento do pH do produto e melhorar suas valores entre 14 e 15, já os próximos a 30 são considerados como “super iogurtes”, por serem mais concentrados (CECCHI, 2003; BORGES et al., 2009).

No que se refere a atividade antioxidante medida pelo DPPH e FRAP, observa-se que no DPPH houve diferença ($p<0,05$) entre as formulações, sendo maior (64,75) e menor (71,42), nos dias 1 e 150, respectivamente, na formulação 1. Enquanto para o FRAP, houve diferença ($p<0,05$) entre as formulações apenas no dia 1, com maior média na formulação 1 (1251,58). Já os fenólicos totais, diferiram apenas no dia 30, sendo mais expressivo na formulação 1 (0,11) do que na formulação 2 (0,06). Embora tenha ocorrido diferença significativa ($p<0,05$) entre o DPPH, FRAP e fenólicos totais em algum momento da estocagem, pode-se concluir que a presença de *B. clausii* pouco influenciou esses parâmetros (Tabela 2). A

atividade antioxidante apresentada pelo iogurte de cajá (F1 e F2) (Tabela 2) é resultante da presença de compostos bioativos com ação antioxidante

provenientes do cajá (CARVALHO et al., 2011), os quais favorecem a conservação de alimentos (FERNANDEZ; MARETTE, 2017).

Tabela 2. Características físico-química e químicas do iogurte com e sem *Bacillus clausii* ao longo de 150 dias de estocagem sob refrigeração. 2019.

Resposta*	Tempos (dias)	Formulação 1	Formulação 2	P-valor ¹
pH	1	4,94±0,04 ^b	5,20±0,02 ^a	<0.001
	30	4,97±0,02 ^b	5,10±0,01 ^a	<0.001
	60	5,02±0,01 ^a	4,91±0,00 ^b	<0.001
	150	4,74±0,01 ^a	4,15±0,03 ^b	<0.001
	P-valor ²	<0.001	<0.001	
Sólidos Solúveis Totais	1	22,33±0,58 ^a	24,33±1,15 ^a	0,055
	30	27,33±0,58 ^a	24,00±0,00 ^b	0,001
	60	25,67±0,58 ^a	25,33±1,15 ^a	0,678
	150	27,00±1,00 ^a	25,00±0,00 ^b	0,026
	P-valor ²	<0.001	0,250	
DPPH	1	64,75±2,67 ^a	53,23±0,90 ^b	0,002
	30	86,53±1,70 ^a	85,63±1,29 ^a	0,508
	60	47,81±1,29 ^a	44,72±3,92 ^a	0,265
	150	71,42±6,14 ^b	84,04±2,58 ^a	0,030
	P-valor ²	<0.001	<0.001	
FRAP	1	1251,58±32,61 ^a	1133,92±55,59 ^b	0,034
	30	932,67±41,61 ^a	920,33±37,09 ^a	0,721
	60	821,58±20,89 ^a	822,92±34,06 ^a	0,957
	150	1253,42±26,08 ^a	1312,25±48,67 ^a	0,139
	P-valor ²	<0.001	<0.001	
Fenólicos Totais	1	0,05±0,00 ^a	0,05±0,01 ^a	0,367
	30	0,11±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,003
	60	0,80±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,502
	150	0,10±0,02 ^a	0,09±0,01 ^a	0,578
	P-valor ²	<0.001	0,001	

*Média e desvio padrão. Formulação 1 (com *Bacillus clausii*) e Formulação 2 (sem *Bacillus clausii*). Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste t-Student não pareado¹. Valor de probabilidade obtido pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial². pH: expressos em concentração de hidrogênio; Sólidos solúveis totais: expressos em °Brix; Fenólicos totais (FT): expresso em mmol de equivalentes de ácido gálico/100g amostra; DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil): expresso em µmol equivalente de trolox/100 g de amostra; FRAP (Redução do ferro): expresso em Kg equivalente de sulfato ferroso/100 g de amostra.

3.2. Avaliação microbiológica

Na Tabela 3, estão expostos a estabilidade microbiológica das formulações de iogurte de cajá (com *Bacillus clausii* - F1 e sem *Bacillus clausii* - F2) ao longo de 150 dias de estocagem.

Tabela 3. Estabilidade microbiológica do iogurte com e sem *Bacillus clausii* ao longo de 150 dias de estocagem. 2019.

Parâmetros*	Tempos (dias)	Formulação 1	Formulação 2
Fungos	1	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$3,9 \times 10^4$ (estimado)
	30	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$<1 \times 10^2$ (estimado)
	60	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$<1 \times 10^2$ (estimado)
	150	$2,5 \times 10^4$ (estimado)	$2,5 \times 10^4$ (estimado)
Coliformes Totais	1	<3	<3
	30	<3	<3
	60	<3	<3
	150	<3	<3
Coliformes Termotolerantes	1	<3	<3
	30	<3	<3
	60	<3	<3
	150	<3	<3
E. coagulase positiva	1	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$<1 \times 10^2$ (estimado)
	30	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$<1 \times 10^2$ (estimado)
	60	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$<1 \times 10^2$ (estimado)
	150	$<1 \times 10^2$ (estimado)	$<1 \times 10^2$ (estimado)
Salmonella sp.	1	Ausência	Ausência
	30	Ausência	Ausência
	60	Ausência	Ausência
	150	Ausência	Ausência

*Média da triplica de cada diluição. Os coliformes são expressos em NMP/ g de iogurte. Os fungos e *Estafilococcus* coagulase positiva são expressos em UFC/ g de iogurte. A *Salmonella sp* é expressa em ausência ou presença em 25g de iogurte.

Observou-se que houve o crescimento apenas de colônias típicas de fungos nos iogurtes avaliados, sendo os resultados expressos entre $<1 \times 10^2$ (estimado) a $3,9 \times 10^4$ (estimado). Ao comparar as formulações, observa-se que o crescimento fúngico progrediu ($<1 \times 10^2$ (estimado) a $2,5 \times 10^4$ (estimado)) na F1 e regrediu ($3,9 \times 10^4$ (estimado) a $2,5 \times 10^4$ (estimado)) na F2 ao longo da estocagem. Demonstrando que a provável atividade do *B. clausii* pode ter influenciado o pH (Tabela 2) e consequentemente a atividade fúngica. Nas demais avaliações microbiológicas, mesmo não havendo tubos positivos para os coliformes e crescimento de colônias típicas de *Estafilococcus* coagulase positiva e *Salmonella sp* (Tabela 3), deve-se expressar seus resultados, sendo assim, os coliformes totais e coliformes termotolerantes são expressos em $<3,0$ NMP/g de iogurte; $<1 \times 10^2$ (estimado) UFC de *Estafilococcus* coagulase positiva/g de iogurte, e ausência de colônias típicas de *Salmonella sp* em 25g de iogurte (SILVA et al., 2010).

O pH mais ácido encontrado nos iogurtes pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos mais tolerantes à acidez, como os fungos (FERNANDES et al., 2015). Segundo Thamer e Penna (2006), o pH ideal para a produção de iogurte é 4,8, desta maneira, esse pH pode favorecer a proliferação de fungos e

consequente biodeterioração do iogurte com aparecimento de aroma desagradável, perda de textura e dilatação do recipiente pela produção de gás (TOLEDO, 2013). Iogurtes adoçados ou com frutas são susceptíveis ao crescimento de fungos, sendo então necessário evitar a contaminação dos produtos por esses microrganismos, devendo haver maior rigor desde a seleção das matérias-primas até a estocagem do produto (RODAS et al., 2001; TOLEDO, 2013).

De acordo com a RDC nº 12, o iogurte, só podem conter até 10 número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes/mL de iogurte e ausência de *Salmonella sp* em 25mL de iogurte (BRASIL, 2001), enquanto que a Instrução normativa nº 46 preconiza o máximo de 100NMP de coliformes totais/mL de iogurte, 10NMP de coliformes termotolerantes/mL de iogurte e 200 unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos/g de iogurte (BRASIL, 2007).

Sendo assim, diante dos resultados verificados na Tabela 3, as formulações de iogurte de cajá propostas não atenderam ao que é preconizado pela legislação (BRASIL, 2007) no que se refere as UFC de fungos/g de iogurte no dia 1 da formulação 2 ($3,9 \times 10^4$ (estimado)) e no dia 150 ($2,5 \times 10^4$ (estimado)) em ambas as formulações, o que talvez possa ser solucionado com a adição de um aditivo

(conservante) alimentar, sendo que o produto proposto era sem aditivos alimentares.

3.3. Viabilidade do *Bacillus clausii* em iogurte

Tabela 4. Número de UFC do *Bacillus clausii* no iogurte ao longo de 150 dias. 2019.

Tempos (dias)	UFC do <i>Bacillus clausii</i> /g de iogurte
1	$8,0 \times 10^9$
30	$1,4 \times 10^9$
60	$2,7 \times 10^9$
150	$4,1 \times 10^8$

UFC: Unidades formadoras de *Bacillus clausii*/g de iogurte

A legislação brasileira afirma que para a consideração de propriedades probióticas em um produto, deve haver testes que comprovem a quantidade mínima sugerida para benefícios, entre 10^8 a 10^9 UFC/g (BRASIL, 1999). Desta forma, os resultados obtidos confirmam a presença de cepas do *Bacillus clausii* em quantidades estabelecidas pela legislação nos dias 1, 30, 60 e 150. Os resultados demonstraram que o *Bacillus clausii* permaneceu viável ao longo dos 150 dias de estocagem, com contagem final de $4,1 \times 10^8$ UFC/g de iogurte de cajá, assim o iogurte com cajá é um meio propício para a viabilidade do *Bacillus clausii* (Tabela 4).

O uso de probióticos esporulados em alimentos apresenta como vantagem principal a sua maior resistência as etapas de processamento e estocagem dos

A viabilidade do *Bacillus clausii* no iogurte de cajá está disposta na Tabela 4.

produtos alimentícios, por permanecerem mais tempo viáveis, até em temperaturas mais baixas e pH reduzidos, como durante a fermentação de bebidas lácteas (ALVES, 2017; SOARES, 2017). Os alimentos são veículos ideais para adição probióticos, tanto pelas condições físico-químicas e nutrientes vitais que favorecem o desenvolvimento e viabilidade dos microrganismos, quanto por protegerem das condições extremas ao longo do trato gastrointestinal (SOARES, 2017).

4. Conclusões

A composição centesimal do iogurte de cajá demonstrou que ele é fonte de proteína, e parcialmente desnatado. Quanto a sua estabilidade durante a estocagem sob refrigeração, observou-se que houve variação significativa em todos os parâmetros físico-químicos e químicos

avaliados em ambas as formulações, com destaque para o pH do iogurte de cajá com *B. clausii* o qual mostrou-se menos ácido a partir do dia 60 de estocagem. Os SST foram maiores no iogurte de cajá com *B. clausii* apenas no dia 30 e 150 de estocagem. O DPPH, FRAP e fenólicos totais embora tenham variado em algum momento da estocagem, supõe-se que a presença de *B. clausii* exerceu pouca influência nesses parâmetros. No que se refere a estabilidade microbiológica, houve apenas crescimento de fungos durante a estocagem, com aumento e redução no número de colônias de fungos, no iogurte de cajá com *B. clausii* e sem *B. clausii*, respectivamente. O iogurte de cajá demonstrou ser uma matriz alimentícia viável para os esporos do *Bacillus clausii* o que o torna um produto com alegação de propriedade funcional.

5. Referências

1. ALMEIDA, K.E.D., BONASSI, I.A.; ROÇA, R.D.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Food Science and Technology (Campinas)**, p. 187-192, 2001.
2. ALVES, N.B. Seleção de bacillus spp. resistentes ao suco gástrico. **Anais Seminário de Iniciação Científica**, n. 21, 2017.
3. BELLARDE, F.B. Elaboração de doce de leite pastoso com substituição parcial dos sólidos de leite por concentrado protéico de soro. **REVISTA UNIARA**, n.17-18, p. 249-254, 2005/2006.
4. BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal Biochem.**; 239 (1): 706. 1996.
5. BISCAIA, I.M.F.; STADLER, C.C.; PILATTI, L. A. Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas. **Simpósio de Engenharia de Produção-SIMPEP**, v. 11, 2004.
6. BORGES, K.C., Medeiros, A.C.L.; CORREIA, R.T.P. Iogurte de leite de búfala sabor cajá (*Spondias lútea* L.): caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 295-300, 2009.
7. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London. 1995; 28 (1): 25-30.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União, Brasília**, 1999.
9. BRASIL. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da saúde. Dispõe sobre padrões microbiológicos sanitários para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 03 janeiro de 2001.
10. BRASIL. Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2005.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União: Brasília, DF**, 24 de outubro de 2007.

12. BRASIL. Instituto Adolfo Lutz - IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 4. ed. **São Paulo: IAL**, 2008.
13. BRASIL. Ministério da saúde. RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012. Regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. **Diário oficial da união: Brasília**, 13 de novembro de 2012.
14. CAPITANI, C.; HAUSCHILD, F.A.D.; FRIEDRICH, C.J.; LEHN, D.N. & DE SOUZA, C.F. V. Caracterização de iogurtes elaborados com probióticos e fibra Solúvel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, p. 1285-1300. 2014.
15. CARVALHO, A.V.; CAVALCANTE, M.D.A.; SANTANA, C.L.; ALVES, R.M. Características físicas, químicas e atividade antioxidante de frutos de matrizes de cajazeira no estado do Pará. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2011.
16. CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2ª edição. **Campinas: UNICAMP**, 207p. 2003.
17. DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E.V.D.B.; SOARES, J.M.S.; CALIARI, M.; PAULA, M.D.; ASQUIERI, E.R. Avaliação química de geleias de manga formuladas com diferentes níveis de cascas em substituição à polpa. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 33, n. 1, p. 177-184. 2009.
18. DUC, L.H., HONG, H.A., BARBOSA, T.M., HENRIQUES, A.O., & CUTTING, S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Appl Env Microbiology**, v.70, 2161-71p. 2004.
19. FERNANDES, E.N., DA CUNHA ABREU, C., DE CASTRO OLIVEIRA, I., RASMINI, J.P.Á., & DA CUNHA, A.F. Qualidade físico-química de iogurtes comercializados em Viçosa (MG). **ANAIS SIMPAC**, v. 5, n. 1, 2015.
20. FERNANDEZ, M.A.; MARETTE, A. Potential health benefits of combining yogurt and fruits based on their probiotic and prebiotic properties. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 155S-164S, 2017.
21. FERREIRA, F.C.P.; PAIVA, Y.F.; ALMEIDA, R.B.C.B.; SILVA, A.R.M.; ARAÚJO, A.S. Elaboração e avaliação sensorial de iogurte natural com polpa de abacaxi base mel. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, n. 1, 2015.
22. FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, 365-378p. 1989.
23. GIESE, S., COELHO, S.R.M., TÉO, C.R.P.A., NÓBREGA, L.H.P., & CHRIST, D. Caracterização físico-química e sensorial de iogurtes comercializados na região Oeste do Paraná. **Varia Scientia Agrárias**, v. 1, n. 1, p. 121-129, 2010.
24. GONÇALVES, N.M.; FERREIRA, I.M.; SILVA, A.M.O.; CARVALHO, M.G. Iogurte com geleia de cajá (*Spondias mombin* L.) adicionado de probióticos: avaliação microbiológica e aceitação sensorial. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 1, p. 54-63, jan-mar, 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20180006>
25. GRANDI, A.Z.; ROSSI, D.A. Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 69, n. 1, 2010.
26. HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacterio therapy and bacterio prophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied Environmental Microbiology**. v.66, p. 5241-5247, 2000.

27. MATA, M.E.C.; DUARTE, M.; ZANINI, H. L. Calor específico e densidade da polpa de cajá (*Spondias lutea* L.) com diferentes concentrações de sólidos solúveis sob baixas temperaturas. **Engenharia agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, 2005.
28. MATTIETTO, R.A., LOPES, A.S.; MENEZES, H.C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de duas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, 13, 2010. 156–164p.
29. MAZOCHI, V.; MATOSJÚNIOR, F.E.; VAL, C.H.; DINIZ, D.N.; REZENDE, A.F.; NICOLI, J.R.; SILVA, A.N. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com *Bifidobacterium* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, 2010.
30. RAMESH, C.C. Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. **Hoboken: Blackwell Publishing**, 2006.
31. REIS, R.C.; MINIM, V.P.R.; DIAS, B.R.P.; CHAVES, J.B.P.; MINIM, L.A. Impacto da utilização de diferentes edulcorantes na aceitabilidade de iogurte “light” sabor morango. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, 53-60p. 2009.
32. RIBEIRO, M.E. Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Estadual de Campinas**. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, [s.n], 2011.
33. RODAS, M.A.B.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L.Z.; SGARBI, C.R. & LOPES, W.C. caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 3, 304-309p, dec. 2001.
34. SCHMIDT, C.A.P.; PEREIRA, C.; ANJOS, G.D. & LUCAS, S.D.M. Formulação e avaliação sensorial hedônica de iogurte com polpa de acerola. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**. 2012.
35. SILVA, A.N.; NAVARRO, R.C.S.; FERREIRA, M.A.M.; MINIM, V.P.R.; COSTA, T.M.T.; PEREZ, R. Performance of hedonic scales in sensory acceptability of strawberry yogurt. **Food Quality and Preference**, v. 30, n. 1, 9-21p. 2013.
36. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. **São Paulo: Varela**, 624 p. 2010.
37. SILVA, S.V. Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - **Universidade Federal de Santa Maria, RS**. 107f. 2007.
38. SOARES, E.B.; GOMES, R.L.F.; CARNEIRO, J.G.M.; NASCIMENTO, F.N.; SILVA, I.C.V.; COSTA, J.C.L. Caracterização física e química de frutos de cajazeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, 518-519p. 2006.
39. SOARES, M.B. Avaliação da sobrevivência de esporos de *Bacillus* sp. probióticos em matrizes alimentares e seus efeitos à saúde. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual de Campinas**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 2017.
40. SOROKULOVA, I. Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. **J Prob Health** 1:e106, 2013.
41. SOUZA, A.L.C. Desenvolvimento de novos produtos probióticos a partir do caju (*Anacardium occidentale* L.). Tese de doutorado (Biotecnologia), Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) na **Universidade Federal de Sergipe** – São Cristóvão, SE. 110f. 2017.
42. SWAIN T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. – The quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**; 10(1): 63-8. 1959.
43. TACO. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ª ed. Campinas (SP): Ed. **NEPAUNICAMP**; 161p. 2011.

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

45. TOLEDO, N.M.V. Aproveitamento de subprodutos da industrialização do maracujá para elaboração de iogurte. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2013.

46. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.