

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARINÉZ DE SOUZA

**APLICAÇÃO DE EXTRATO DE CAFÉ EM IOGURTE PROBIÓTICO: EFEITO NAS
PROPRIEDADES QUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
SENSORIAIS**

MEDIANEIRA

2023

MARINÊZ DE SOUZA

**APLICAÇÃO DE EXTRATO DE CAFÉ EM IOGURTE PROBIÓTICO: EFEITO NAS
PROPRIEDADES QUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
SENSORIAIS**

**Application of coffee extract in probiotic yogurt: effect on chemical, physical-
chemical, microbiological and sensory properties**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de
Alimentos do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Dra. Eliane Colla.

Coorientador(a): Dra. Deisy Alessandra Drunkler.

MEDIANEIRA

2023



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira**



MARINEZ DE SOUZA

APLICAÇÃO DE EXTRATO DE CAFÉ EM IOGURTE PROBIÓTICO: EFEITO NAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 29 de Junho de 2023

Dra. Eliane Colla, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Charise Dallazem Bertol, Doutorado - Universidade de Passo Fundo (Upf)

Dra. Daneysa Lahis Kalschne, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Marly Sayuri Katsuda, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 30/06/2023.

Dedico este trabalho a meus pais Jorge Eloir de Souza e Antonia Dias de Souza e Juliano Mazzola, meu marido, sem vocês não teria chegado até aqui!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e pelas pessoas especiais que colocou em minha vida.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

A professora Dra. Eliane Colla pela dedicação, ensinamentos e orientação desse trabalho.

A professora Dra. Deisy Alessandra Drunkler, pelos ensinamentos e coorientação desse estudo.

Aos colegas de trabalho Ademir Mattana, Miriam Cristina da Silva Gomes, Rafaela Bildhauer Dalazen, Sthefanie Oliveira de Moura, Tatiane Bertoldo e Valquiria Silva Vieira, gostaria de externar minha satisfação de poder conviver com eles durante a realização desta pesquisa.

Agradeço aos pesquisadores e professores da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio. E por último, e nem por isso menos importante, agradeço a meu esposo Juliano Mazzola pelo companheirismo, carinho, amor e compreensão.

RESUMO

Produtos lácteos como os iogurtes apresentam alto valor nutritivo, porém são passíveis da ação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, o que torna importante o desenvolvimento de alternativas para reduzir ou eliminar essa microbiota indesejável. O uso de substâncias de origem natural, como o extrato de café, consiste em uma opção interessante por apresentar potencial antimicrobiano, além de proporcionar um sabor apreciável pelos consumidores. Este trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de extrato de *Coffea canephora* torrado sobre o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em iogurte probiótico, além das bactérias iniciadoras e probióticas. Foram produzidas formulações de iogurte com a adição de extrato de café canéfora a 5,0% (EC) e culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (La) e/ou *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bal). Foram obtidos oito ensaios, um correspondente ao padrão (P) sem extrato de café ou presença de microrganismos probióticos (P, PEC, PLa, PLaEC, PBal, PBalEC, PLaBal e PLaBalEC). As oito formulações foram repetidas e contaminadas com quantidades conhecidas de cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888, o que correspondeu ao controle positivo. As amostras sem microrganismos contaminantes corresponderam ao controle negativo. O crescimento microbiano foi avaliado durante sete semanas (42 dias) por meio da contagem em placas das culturas lácticas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; além de *E. coli*, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras. Para os ensaios do controle negativo foi realizada a caracterização da composição química, propriedades físico-químicas, perfil de textura e viscosidade, qualidade microbiológica e avaliação sensorial. Identificou-se que houve manutenção da viabilidade dos microrganismos das culturas iniciadoras e probióticas em presença do extrato de café. Constatou-se atuação do extrato de café como inibidor de crescimento de *E. coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium após 6 a 7 semanas de armazenamento. Pode-se dizer que houve efeito antimicrobiano do extrato de *C. canephora* torrado sobre o crescimento de microrganismos patogênicos sem que fosse afetada a viabilidade das culturas iniciadoras e probióticas no iogurte formulado. Verificou-se ainda que os iogurtes foram classificados como integrais quanto ao teor de lipídeos e apresentaram-se em conformidade com a legislação brasileira para o teor de proteínas e acidez. As propriedades físico-químicas, perfil de textura e viscosidade analisados mantiveram-se de acordo com os aspectos tecnológicos para o desenvolvimento de iogurtes. Para os atributos sensoriais de aparência, cor, sabor, textura e impressão global avaliados em P, PEC, PLaBal e PLaBalEC, os ensaios com extrato de café tiveram índices de aceitabilidade menores, exceto para o atributo aroma, onde o iogurte probiótico com adição de extrato de café apresentou índice de aceitabilidade superior. Considerando-se a impressão global, os quatro ensaios apresentaram valores superiores a 70%, admitido como percentual mínimo de índice de aceitabilidade. Os resultados indicam que o extrato de café canéfora pode ser aplicado como agente antimicrobiano alternativo no controle de patógenos em produtos lácteos contendo microrganismos probióticos, além do seu potencial sob o ponto de vista tecnológico, para aplicação em outras matrizes alimentares.

Palavras-chave: leite fermentado; *Lactobacillus acidophilus*; *Salmonella typhimurium*; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Dairy products such as yogurts have a high nutritional value, being susceptible to the action of deteriorating and pathogenic microorganisms, which makes it important to develop alternatives to reduce or eliminate the undesirable microbiota in these products. The use of substances of natural origin, such as coffee extract, is an interesting option because it has antimicrobial potential, in addition to providing an appreciable flavor by consumers. This work aimed to evaluate the effect of adding roasted *Coffea canephora* extract on the growth of pathogenic and spoilage microorganisms in probiotic yogurt, in addition to the starters and probiotic bacteria. Yogurt formulations were produced with the addition of 5.0% *Coffea canephora* extract (EC) and probiotic cultures of *Lactobacillus acidophilus* (La) and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bal). Eight assays were obtained, one corresponding to the standard (P) without coffee extract or the presence of probiotic microorganisms (P, PEC, PLa, PLaEC, PBal, PBalEC, PLaBal and PLaBalEC). The eight formulations were repeated with strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 and *Escherichia coli* ATCC 43888, which corresponded to the positive control. Samples without contaminating microorganisms corresponded to the negative control. Microbial growth was evaluated for seven weeks (42 days) by counting the lactic cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; of the probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; in addition to *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and molds and yeasts. For the negative control assays, the characterization of the chemical composition, physical-chemical properties, texture and viscosity profile, microbiological quality and sensory evaluation was carried out. It was identified that there was the maintenance of the viability of the microorganisms of the starter cultures and probiotics in the presence of the coffee extract. However, the coffee extract acted as a growth inhibitor for *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium after 6 to 7 weeks of storage. Therefore, it can be said that there was an antimicrobial effect of the roasted *Coffea canephora* extract on the growth of pathogenic microorganisms without affecting the viability of starter cultures and probiotics in the formulated yogurt. It was also verified that the yogurts complied with the Brazilian legislation for the contents of lipids, proteins and acidity. The physical-chemical properties, texture profile and viscosity analyzed remained under the technological aspects for the development of yogurts. Regarding the sensory attributes of appearance, color, flavor, texture and overall impression evaluated in P, PEC, PLaBal and PLaBalEC, the tests with coffee extract (PEC and PLaBalEC) had lower acceptability indices, except for the aroma attribute, where the probiotic yogurt with the addition of coffee extract showed a higher acceptability index. Considering the overall impression, the four tests showed values greater than 70%, admitted as a minimum percentage of the acceptability index. The results indicate that the canephora coffee extract can be applied as an alternative antimicrobial agent in the control of pathogens in dairy products containing probiotic microorganisms, and also indicate its potential from the technological point of view, for application in other food matrices.

Keywords: fermented milk; *Lactobacillus acidophilus*; *Salmonella typhimurium*; *Escherichia coli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estratégia experimental para produção dos ensaios do iogurte probiótico e incorporação do extrato de café.....	36
Figura 2 - Esquema da retirada da unidade analítica e preparação das diluições decimais seriadas para realização das análises microbiológicas	40
Figura 3 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	41
Figura 4 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de <i>Escherichia coli</i>	42
Figura 5 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de <i>Salmonella</i> sp	43
Figura 6 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de bolores e leveduras.....	44
Figura 7 - Contagem de <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para os grupos controle positivo ou negativo	53
Figura 8 - Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para os grupos controle positivo ou negativo ...	56
Figura 9 - Contagem de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para os grupos controle positivo ou negativo.....	57
Figura 10 - Contagem de <i>Escherichia coli</i> nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para o grupo controle positivo	60
Figura 11 - Contagem de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para o grupo controle positivo.....	61
Figura 12 - Representação da média (ponto) e desvios padrão (barras acima e abaixo da média) das variáveis da composição química avaliada em cada ensaio de iogurte	68
Figura 13 - Representação da média (ponto) e desvios padrão (barras acima e abaixo da média) das variáveis das propriedades físico-químicas avaliadas em cada ensaio de iogurte	74
Figura 14 - Representação da média (ponto) e desvios padrão (barras acima e abaixo da média) das variáveis de textura e viscosidade avaliadas em cada ensaio de iogurte.....	81
Figura 15 - Resultados do levantamento de dados sócio-demográficos dos provadores.....	85
Figura 16 - Percentual de respostas dos provadores para a frequência e consumo de café e iogurte e critérios de escolha durante a compra	86
Figura 17 - Percentual de respostas dos provadores para frequência e consumo iogurte probiótico e produtos com adição ou sabor café e interesse por alimentos saudáveis e probióticos	87
Figura 18 - Índice de aceitabilidade dos atributos aparência, aroma, cor, sabor, textura e impressão global dos quatro ensaios de iogurte	91
Figura 19 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos atributos aparência, aroma, cor, sabor, textura e impressão global de quatro ensaios de iogurte....	92
Figura 20 - Correlograma no qual cada intersecção indica a associação entre dois atributos sensoriais, independente do ensaio	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações dos ensaios para produção do iogurte probiótico e incorporação dos extratos de café	38
Tabela 2 - Enumeração dos microrganismos <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (log UFC/g) nos oito ensaios de iogurte	52
Tabela 3 - Enumeração dos microrganismos <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (log UFC/g) nos oito ensaios de iogurte	55
Tabela 4 - Enumeração dos microrganismos patogênicos (log UFC/g) e pHs inicial (T1) e final (T7) nos oito ensaios do controle positivo de iogurte	59
Tabela 5 - Resultados para os parâmetros de composição química dos oito ensaios de iogurte.....	67
Tabela 6 - Resultados para os parâmetros de propriedades físico-químicas dos oito ensaios de iogurte	73
Tabela 7 - Resultados para os parâmetros de textura e viscosidade dos oito ensaios de iogurte.....	80
Tabela 8 - Resultados do teste de escala hedônica de quatro ensaios de iogurte	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Iogurte	15
3.2	Alimentos funcionais	16
3.3	Microrganismos probióticos	19
3.3.1	Gênero <i>Lactobacillus</i>	21
3.3.2	Gênero <i>Bifidobacterium</i>	22
3.4	Microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos	24
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	25
3.4.2	<i>Salmonella</i> sp.	27
3.5	Aditivos naturais em alimentos	28
3.6	Café	29
3.6.1	Composição e propriedades do café	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Matéria-prima e microrganismos	35
4.2	Obtenção e caracterização do extrato de café	35
4.3	Produção do iogurte probiótico e incorporação do extrato de café ..	36
4.3.1	Ativação e padronização das cepas contaminantes.....	38
4.4	Acompanhamento do crescimento microbiano	39
4.4.1	Metodologias das análises microbiológicas.....	39
4.4.1.1	<u>Preparo das diluições decimais seriadas</u>	<u>39</u>
4.4.1.2	<u>Enumeração de <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>, <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i></u>	<u>40</u>
4.4.1.3	<u>Enumeração de <i>Escherichia coli</i></u>	<u>42</u>
4.4.1.4	<u>Enumeração de <i>Salmonella</i> sp.</u>	<u>42</u>
4.4.1.5	<u>Enumeração de bolores e leveduras</u>	<u>44</u>
4.5	Análises de composição química, propriedades físico-químicas e perfil de textura e viscosidade	44

4.6	Análise sensorial	46
4.7	Análise estatística dos dados	47
4.7.1	Composição química, propriedades físico-químicas, perfil de textura e viscosidade e crescimento microbiano	47
4.7.2	Análise sensorial	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Ação do café sobre culturas iniciadoras, probióticas, deteriorantes e patogênicas	51
5.2	Análise da composição química dos iogurtes	66
5.3	Análise das propriedades físico-químicas dos iogurtes	72
5.4	Perfil de textura e viscosidade dos iogurtes	79
5.5	Caracterização microbiológica e análise sensorial	84
5.5.1	Caracterização dos provadores	84
5.5.2	Teste de aceitação	88
5.5.3	Análise de Componentes Principais (ACP)	92
6	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	118
	APÊNDICE B - MODELO DE FICHA DO TESTE DE ESCALA HEDÔNICA 125	
	APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO PARA LEVANTAMENTO DE DADOS	127

1 INTRODUÇÃO

Os leites fermentados, como o iogurte, são ricos em nutrientes e por isso são substratos adequados para a ação de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (ABDELHAMID; EDRIS; SADEK, 2023). Autores como Carochó, Morales e Ferreira (2015) e Misra *et al.* (2017) destacam que mesmo diante de uma ampla disponibilidade de meios tecnológicos empregados na conservação, a presença de microrganismos indesejados nesses alimentos ainda é uma problemática. Nesse contexto, se justifica a necessidade de explorar alternativas que visem contribuir com a inibição da microbiota indesejável na indústria de laticínios.

Nesse sentido destaca-se o uso de substâncias antimicrobianas encontradas em vegetais e em grãos, como é o caso do café, conhecido por apresentar uma diversidade de características distintas referentes a sabor, níveis de torra, presença ou ausência de cafeína, presença de ácidos clorogênicos, melanoidinas, entre outros, o que faz com que se destaque como uma das bebidas mundialmente mais consumidas (BUTT; SULTAN, 2011).

Dentre os principais benefícios do consumo de café podem ser citados os efeitos antioxidantes e prevenção contra o câncer, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (SUN *et al.*, 2006). O extrato deste pode contribuir com o controle do crescimento microbiano, sem provocar riscos aos consumidores ou comprometer a segurança desses produtos, ou seja, amplia sua longevidade sem impactar sua integridade (SINGH, 2018), aliado a um sabor apreciável.

Outro fator importante a ser considerado sobre o iogurte é que os produtos lácteos fermentados são considerados alimentos adequados para a administração de bactérias probióticas ao consumidor (CASTEELE *et al.*, 2006). Para tanto, é usual incorporar bactérias iniciadoras (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) juntamente com culturas probióticas (SHORI; BABA, 2015).

No caso do iogurte, as bactérias da cultura *starter* não sobrevivem às condições gastrointestinais ou não possuem a capacidade de colonizar o intestino humano, o que torna improvável que forneçam benefícios terapêuticos (SHAH; JELEN, 1990; SHAH, 2000; THARMARAJ; SHAH, 2003). Por esta razão, microrganismos probióticos são adicionados junto com as culturas *starters* do iogurte visando alcançar benefícios funcionais para os seres humanos já que se tratam de microrganismos

vivos com capacidade de transitar pelo trato gastrointestinal e, ao fazê-lo, beneficiam a saúde do consumidor (TANNOCK *et al.*, 2000; SACCARO *et al.*, 2011).

Várias espécies dos gêneros *Bifidobacterium* sp. e *Lactobacillus* sp. vêm recebendo atenção como probióticos. Dentre os benefícios da associação desses microrganismos estão a contribuição para uma recolonização mais rápida da microbiota intestinal após administração de antibióticos, tratamento e prevenção da diarreia, alívio da constipação, possível tratamento da doença inflamatória intestinal, redução da intolerância à lactose em alguns indivíduos, redução no nível de colesterol sérico, aumento da resistência à infecções microbianas, impacto na função imunológica e papel potencial na prevenção do câncer (VARGA, 1999; MÖLLER; DE VRESE, 2004; LEAHY *et al.*, 2005; MORIYA *et al.*, 2006; ZAVISIC *et al.*, 2012; SULE *et al.*, 2014).

Canci *et al.* (2022) estudaram o potencial antimicrobiano de extratos de café arábica (*Coffea arabica*) e canéfora (*Coffea canephora*) sobre o crescimento de microrganismos patogênicos e bactérias lácticas, observando que os extratos não afetaram o crescimento microbiano de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*, mas inibiram a atividade biológica das bactérias patogênicas testadas (*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). Dessa maneira concluíram que, o uso de extratos de café pode consistir em uma opção como conservante em alimentos funcionais, por permitir o crescimento dos probióticos enquanto atua na inibição de microrganismos patogênicos.

Diante desse exposto, acredita-se que por meio do uso de compostos bioativos de origem natural como o extrato de café pode-se melhorar a qualidade microbiológica de produtos lácteos durante sua vida útil (MUELLER *et al.*, 2011; JUNSATHIAN *et al.*, 2018; MANCINI; WANG; WEAVER, 2018).

Portanto, espera-se verificar se há interferência do extrato de café no desenvolvimento da cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* presentes no iogurte produzido e, ainda, identificar se a espécie de *Coffea* sp. estudada possui potencial de inibição no crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras, conforme preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2022). Também espera-se contribuir com informações científicas de uma possível alternativa de saborização em produtos lácteos, associada ao aumento da vida útil desses produtos e à benefícios funcionais para os consumidores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato de *Coffea canephora* torrado sobre o crescimento microbiano de culturas iniciadoras, probióticas e microrganismos deteriorantes e patogênicos em iogurte probiótico.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar diferentes formulações de iogurte probiótico;
- Avaliar o efeito do extrato de café canéfora torrado sobre a contagem dos microrganismos da cultura *starter* (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) durante 42 dias de armazenamento refrigerado, a fim de verificar a manutenção da viabilidade celular;
- Acompanhar o crescimento dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* adicionados ao iogurte;
- Verificar a atuação do extrato de café sobre o crescimento dos microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e bolores e leveduras;
- Caracterizar as formulações de iogurte em relação à composição química (gordura, proteína total, umidade, extrato seco total e teor de extrato seco desengordurado) e propriedades físico-químicas (pH, acidez, cor e sinérese);
- Avaliar o perfil de textura (firmeza, elasticidade, coesividade e gomosidade) e viscosidade das formulações de iogurte;
- Realizar a caracterização microbiológica e sensorial dos iogurtes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Iogurte

O consumo de leites fermentados está relacionado a imagem de alimentos saudáveis e nutritivos, já que ocorrem diversas alterações bioquímicas na matéria-prima durante a fermentação que proporciona efeitos benéficos para seus consumidores (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2018; ABDELHAMID; EDRIS; SADEK, 2023).

O iogurte é um leite fermentado que se caracteriza como fonte de sais minerais, dentre eles potássio, zinco, fósforo e cálcio, sendo que este último é essencial para a formação de ossos e dentes, beneficiando o crescimento de crianças e reduzindo os riscos de osteoporose em adultos (DEMIRKOL; TARAKCI, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018; MAHARANI; SOVIANA; PISESTYANI, 2020). Porém, outros benefícios estão associados ao consumo regular de iogurte, como por exemplo:

Melhor digestibilidade de proteínas e açúcares em relação ao leite; estímulo dos movimentos peristálticos em consequência da presença de ácido láctico, facilitando a digestão; combate a problemas bucais; colonização do trato gastrointestinal por microrganismos benéficos; desenvolvimento e manutenção do sistema de sustentação; combate a inflamações e estímulo do sistema imunológico; estímulo da produção de hormônios e enzimas; facilidade na absorção de sais minerais, etc (RIBEIRO *et al.*, 2018, p. 463).

Esse alimento é produzido por meio da fermentação do leite, onde as bactérias utilizadas para sua elaboração são conhecidas como culturas *starters* ou iniciadoras (GARRIGUES, 2017; COOPER, 2019; DESHWAL *et al.*, 2021). Durante o processo fermentativo as bactérias produzem ácido láctico, que irá atuar na proteína do leite e assim conferir ao produto textura e características específicas. Dentre os leites utilizados como matéria-prima, o de vaca é o mais empregado devido a sua maior oferta, porém, os leites de búfalas, cabras, ovelhas, éguas, camelos e iaques também podem ser utilizados (COOPER, 2019).

Em termos legais, “entende-se por iogurte o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se realiza com cultivos de protosimbíóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*” (BRASIL, 2007, p. 02). Além disso, outros microrganismos, como lactobacilos e bifidobactérias também podem ser adicionados

durante ou após a preparação do iogurte (KARAM *et al.*, 2013; COOPER, 2019).

Para produção do iogurte é aquecido o leite a cerca de 85 a 95 °C visando desnaturar as proteínas do soro de modo que se associem as micelas de caseína. Posteriormente, o leite é resfriado até cerca de 42 a 45 °C, para que a cultura *starter* seja adicionada. Essa temperatura é mantida até que seja atingido pH 4,6, portanto, pode variar entre quatro a sete horas de fermentação (RIBEIRO *et al.*, 2018; COOPER, 2019).

No processamento do iogurte a espécie *S. thermophilus* é a primeira a se desenvolver e produzir diacetil, ácido láctico, ácido acético e ácido fórmico. Depois inicia-se a multiplicação de *L. bulgaricus*, que apesar de apresentar crescimento mais lento, possui atividade proteásica, liberando no meio aminoácidos e peptídeos provenientes da hidrólise de proteínas lácteas. Os peptídeos são considerados fatores de crescimento e estimulam novamente o crescimento de *S. thermophilus*. Entretanto, a acidificação do meio cessa o crescimento *S. thermophilus* e facilita o crescimento de *L. bulgaricus*, que produz acetaldeído. Este composto juntamente com o diacetil confere o aroma característico do iogurte (RIBEIRO *et al.*, 2018).

3.2 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais podem ser definidos como aqueles nos quais concentrações de um ou mais ingredientes são modificadas para aumentar suas contribuições para uma dieta saudável (DOROTA; BIRGIT; KLAUS, 2010; COOPER, 2019). De maneira semelhante, Shah (2001) define alimentos funcionais como "alimentos que contêm algum componente promotor de saúde além dos nutrientes tradicionais".

De acordo com Ballini *et al.* (2023) um alimento pode ser considerado funcional se apresentar além de sua composição nutricional básica, efeito benéfico sobre uma ou mais funções fisiológicas, como melhorar a saúde ou diminuir o risco de desenvolver doenças. Portanto, os alimentos funcionais possuem ingredientes ricos em nutrientes, mas também podem ser enriquecidos com vitaminas, minerais, probióticos, prebióticos e fibras (BAKER *et al.*, 2022).

Na contemporaneidade vários componentes alimentares têm sido adicionados a alimentos com a finalidade de promover a saúde, como é o caso dos prébióticos, probióticos e simbióticos (BERG, 1998; ATLAS, 1999; ROWLAND, 1999;

ARYANA; MCGREW, 2007; COOPER, 2019; LAI; HOW; PUI, 2022).

Inicialmente um probiótico foi definido como suplemento alimentar microbiano vivo com capacidade de afetar benéficamente o hospedeiro por melhorar seu balanço microbiano intestinal (FULLER, 1992). Posteriormente essa definição foi modificada por Havenaar e Huis in't Veld (1992) que atribuíram esse termo para "cultura simples ou mista de microrganismos vivos que promove a melhoria das propriedades da microflora nativa do homem e outros animais" (COOPER, 2019). Entretanto, uma nova reformulação dessa definição ocorreu e os probióticos passaram a ser definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (HILL *et al.*, 2014, p. 507).

Desde então, diversos produtos probióticos têm sido desenvolvidos e comercializados, sendo divididos em categorias. Na primeira estão os alimentos fermentados convencionais, que são consumidos pela população principalmente por motivos nutricionais. Na segunda categoria estão os suplementos para alimentos e leites fermentados que utilizam bactérias probióticas em suas formulações. Por último está a categoria dos suplementos alimentares, onde os probióticos são comercializados na forma de cápsulas, tabletes e sachês contendo culturas bacterianas liofilizadas (HUI; EVRANUZ, 2012; TRIPATHI; GIRI, 2014; COOPER, 2019).

Dentre as formas mais comuns de uso dos probióticos estão os produtos lácteos, como leites fermentados e queijos, pois esses produtos promovem o crescimento desses microrganismos durante a fase de fermentação, além de fornecer excelente densidade de nutrientes (SAAD *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2018; FENSTER *et al.*, 2019; DESHWAL *et al.*, 2021). Embora cada cepa de microrganismo seja única, alguns aspectos devem ser considerados quando se seleciona um probiótico, ou seja, deve-se analisar antecipadamente as propriedades tecnológicas de um microrganismo probiótico (RIBEIRO *et al.*, 2018). Além disso, matrizes alimentícias e processos de produção também precisam ser adequadamente selecionados, pois podem afetar a viabilidade da cepa no produto final e no intestino (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Nesse sentido é importante frisar que a sobrevivência dos microrganismos probióticos no produto durante toda a sua vida útil é considerada uma exigência pois trata-se da maneira pelos quais os efeitos benéficos das cepas são verificados (FORSSTEN; SINDELAR; OUWEHAND, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2018). Sendo assim,

pode-se dizer que a preparação de alimentos probióticos precisa ser definida por meio da presença de microrganismos viáveis e em número suficiente para alterar a microbiota intestinal do hospedeiro, onde uma dosagem diária de 6 Log (UFC/g ou mL) de células viáveis é considerada a dose mínima (COOPER, 2019).

Porém, a quantidade das cepas probióticas nos alimentos depende de fatores, como ingredientes utilizados na fabricação, cultura *starter* empregada em conjunto com as culturas probióticas, condições de processamento, temperaturas empregadas durante a produção, condições de aeração, condições da embalagem, estocagem e transporte do produto (TRIPATHI; GIRI, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Entretanto, Ray e Bhunia (2014) salientam que em um alimento funcional probiótico os microrganismos utilizados devem apresentar as seguintes propriedades: fonte ou origem conhecida, resistência ao pH e sais biliares, capacidade de adesão e colonização, exclusão competitiva de patógenos, regulação imune, segurança, estabilidade às condições de processamento de alimentos, boa avaliação sensorial e aceitação do consumidor, eficácia em ensaios clínicos em humanos.

De maneira semelhante, Schillinger (1999), Rivera-Spinoza e Gallardo-Navarro (2010) e Ribeiro *et al.* (2018), destacam que ao adicionar cepas probióticas em alimentos fermentados, é importante considerar o estado fisiológico dos microrganismos adicionados (fase de crescimento logarítmica ou estacionária); a concentração de microrganismo no momento do consumo; as condições físicas de estocagem do produto; a composição química do produto onde as cepas probióticas são adicionadas; a possibilidade de interação entre cepas probióticas e culturas *starter*.

Outro aspecto a ser considerado refere-se aos ingredientes utilizados na formulação da matriz alimentícia, pois podem desempenhar uma ação protetora, neutra ou prejudicial sobre a estabilidade de cepas probióticas (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; FORSSTEN; SINDELAR; OUWEHAND, 2011).

A compatibilidade dos microrganismos probióticos com os diferentes ingredientes utilizados apresenta um papel significativo na sobrevivência destes (TRIPATHI; GIRI, 2014). Glicose, vitaminas, minerais, caseína, hidrolisados de proteína do soro, extrato de levedura e antioxidantes podem ser usados em produtos de origem láctea para aumentar a taxa de multiplicação de espécies probióticas como lactobacilos e bifidobactérias (TRIPATHI; GIRI, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Compostos de origem proteica como concentrado proteico de soro e hidrolisado ácido de caseína também podem promover a multiplicação de

microrganismos probióticos pelo fornecimento de nutrição celular, pela redução do potencial redox do meio e pelo aumento da capacidade tamponante do meio, resultando em uma menor diminuição do pH (DAVE; SHAH, 1996; TRIPATHI; GIRI, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Diante desse contexto pode-se dizer que a realização de pesquisas em produtos lácteos fermentados contendo culturas probióticas vem sendo estimulada, por consistir em uma opção para a produção industrial de alimentos funcionais com esses ingredientes além de representar um nicho de mercado lucrativo e em expansão e constituir-se em uma alternativa promissora no que se refere a influenciar benéficamente a composição e/ou a atividade metabólica da microbiota intestinal de seres humanos.

3.3 Microrganismos probióticos

O termo “probiótico” foi introduzido por Lilly e Stillwell em 1965 sendo definidos como microrganismos que estimulam o crescimento de outros organismos e, a partir de 1989, Roy Fuller enfatiza que eles também seriam benéficos a saúde do hospedeiro (RUIZ *et al.*, 2013). Assim, na contemporaneidade existem diversos alimentos elaborados com microrganismos probióticos, que podem ser definidos como “alimentos contendo microrganismos vivos que melhoram ativamente a saúde dos consumidores, melhorando o equilíbrio da microflora no intestino” (FULLER, 1992; THARMARAJ; SHAH, 2003).

Nesse sentido, estudos realizados por Szajewska, Wanke e Patro (2011) comprovaram que os probióticos apresentam resultados positivos quando administrados em quantidades adequadas tanto em alimentos como em medicamentos. Probióticos são microrganismos vivos que podem afetar o sistema imunológico, modulando as respostas inflamatórias por meio de diferentes mecanismos (ESMAEILI *et al.*, 2018).

Herrera *et al.* (2013) ressaltam que os probióticos vêm desempenhando um papel significativo na atenuação de doenças inflamatórias no trato gastrointestinal e que existem evidências de que sejam capazes de influenciar respostas imunes na mucosa respiratória.

Para isso, alguns critérios devem ser observados visando definir o potencial probiótico dos microrganismos, como por exemplo a capacidade de sobrevivência das

células em ambiente intestinal, tolerando pH baixo (pH 2,5 e 3,5), pepsina do estômago, sais biliares, pancreatina e capacidade de adesão ao muco intestinal (TUO *et al.*, 2013).

Os microrganismos probióticos consistem principalmente nas cepas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas espécies de *Bacillus*, *Pediococcus* e algumas leveduras também foram apontadas com aspectos positivos relacionados à saúde, pois desempenharam papel importante na proteção do organismo contra agentes prejudiciais além de fortalecerem o sistema imunológico (SOCCOL *et al.*, 2010).

Na indústria de alimentos fermentados e laticínios, as bactérias ácido lácticas (BAL), classificadas como gram-positivas, não formadoras de esporos e catalase-negativas, têm sido utilizadas devido a sua capacidade fermentativa e ao seu potencial probiótico, como é o caso de espécies do gênero *Lactobacillus*, importantes para os seres humanos (IBARRA *et al.*, 2012; LINARES; ROSS; STANTON, 2016; PEI *et al.*, 2020).

Microrganismos do gênero *Lactobacillus* quando administrados em quantidades adequadas na dieta proporcionam benefícios para o hospedeiro, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta que diminuem o pH luminal; estímulo ao crescimento de bactérias intestinais benéficas; redução das bactérias patogênicas como o *Clostridium difficile* que está associado a diarreia, câncer de cólon, dermatite atópica, doenças inflamatórias do intestino, diabetes tipo II e distúrbios do sistema nervoso; entre outros efeitos (HILL *et al.*, 2014; GOLDENBERG *et al.*, 2017; PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

Jiang *et al.* (2016) constataram que a fermentação com *Lactobacillus* sp. em produtos alimentícios aumentou as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em seres humanos. Sirilun *et al.* (2016) também identificaram que a fermentação com *Lactobacillus* sp. aumentou as características antibacterianas contra a levedura *Candida* sp.

Entretanto, Shori e Baba (2015) salientam que é crescente o uso de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em conjunto com outras bactérias, como *Lactobacillus acidophilus* ou *Streptococcus thermophilus*. Dentre os benefícios da associação desses microrganismos estão a atividade profilática contra rotavírus infeccioso em crianças e redução do risco de infecção das vias aéreas superiores em adultos saudáveis fisicamente ativos (WEICHERT; SCHROTEN; ADAM, 2012; WEST

et al., 2014).

As bactérias ácido lácticas como as espécies pertencentes aos gêneros de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013) estão prosperando em produtos alimentícios, principalmente em lácteos fermentados ou fortificados (FENG *et al.*, 2015), devido a facilidade de seu uso *in situ* e *ex situ* na preservação de alimentos (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

3.3.1 Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é um grupo filogeneticamente diverso de bactérias que possui mais de 200 espécies distribuídas em diferentes ecossistemas, incluindo o corpo humano e produtos lácteos fermentados (CEAPA *et al.*, 2016).

As espécies de *Lactobacillus* produzem ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos e em seres humanos colonizam o sistema digestivo e mucosa genital feminina. Dentre os principais microrganismos pertencentes a esse grupo estão: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus antri*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus kalixensis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ultunensis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus rhamnosus* (GOLDSTEIN, TYRRELL; CITRON, 2015; WESTERIK *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2020).

Ray e Bhunia (2014) salientam que cepas de *Lactobacillus acidophilus* podem metabolizar o colesterol e que acredita-se que sejam capazes de reduzir os níveis séricos de colesterol em humanos. De maneira semelhante, Kemgang *et al.* (2016) destacam a atuação desses microrganismos em pacientes com doenças crônicas, como obesidade, diabetes e hipertensão. Desse modo os autores frisam a importância de estudos sobre *Lactobacillus* sp. como constituintes de alimentos nutracêuticos.

Utilizados há muito tempo na alimentação humana, algumas bactérias desse gênero possuem elevada resistência aos efeitos destrutivos do sistema digestivo, chegando viáveis ao intestino e promovendo benefícios através da proteção por barreira, absorção de substâncias tóxicas, estimulação do sistema imune, competição por nutrientes e produção de compostos antimicrobianos, o que reduz as chances de infecções, tornando favorável o uso terapêutico para correção do equilíbrio da microbiota

do hospedeiro (ARDITA *et al.*, 2014; ÁLVAREZ *et al.*, 2015; NISHIYAMA *et al.*, 2015; TRINDER *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2020).

Na contemporaneidade existem diversos alimentos elaborados com *Lactobacillus*, pois esses microrganismos são relevantes na fabricação de uma grande variedade de produtos, principalmente os obtidos pela fermentação do leite, como queijos, leites fermentados e iogurtes, que além de características sensoriais únicas, possuem seu consumo associado à melhoria da saúde (BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2014; GARCÍA *et al.*, 2015).

Pothuraju *et al.* (2015) afirmam que os probióticos trazem benefícios quando consumidos em quantidades adequadas e que o gênero *Lactobacillus* contém agentes com essa capacidade, além de promoverem proteção contra microrganismos patogênicos e proporcionarem o equilíbrio da microbiota intestinal. De forma semelhante, Kano *et al.* (2013) destacam que o consumo de *Lactobacillus* sp. pode exercer efeitos benéficos sobre o organismo, como o aumento da imunidade, prevenção contra infecções patogênicas, diarreia aguda, redução no risco de câncer, entre outros.

Segundo Tuo *et al.* (2013) a demanda por alimentos funcionais contendo probióticos tem aumentado, o que motiva a realização de estudos que objetivam rastrear novas linhagens com esse potencial, o que corresponde a uma possível ferramenta biológica voltada à melhoria da saúde pública em escala global. Deste modo, é válido ressaltar os diversos benefícios atribuídos ao uso de *Lactobacillus* sp., no qual demonstra a importância de investimentos em pesquisas, priorizando a qualidade de vida da população.

3.3.2 Gênero *Bifidobacterium*

O trato gastrointestinal de seres humanos apresenta uma grande diversidade de bactérias que desempenham diferentes funções no organismo, entretanto, seu conteúdo bacteriano ainda não é totalmente conhecido (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; LAI; HOW; PUI, 2022).

Porém, dentre os microrganismos específicos da microbiota intestinal destacam-se as bifidobactérias, que podem ser associadas a modulação imune, melhorias na função intestinal, prevenção ou alívio de diarreia infecciosa, contribuição no processo de nutrição e metabolismo e, antagonismo contra patógenos por meio da

secreção de fatores antibacterianos (PICARD *et al.*, 2005; MORONI *et al.*, 2006; SHAH, 2007; WALLACE *et al.*, 2011; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez por Henry Tissier e foram inicialmente denominadas de *Bacillus bifidus communis*, sendo posteriormente renomeadas para gênero *Bifidobacterium* (COOPER, 2019). O pesquisador descobriu que essas bactérias são dominantes na microbiota intestinal de bebês e observou benefícios clínicos de seu uso no tratamento da diarreia em recém nascidos (COOPER, 2019).

Os microrganismos do gênero *Bifidobacterium* são morfologicamente semelhantes a alguns *Lactobacillus* sp. o que fez com que fossem anteriormente incluídos nesse gênero (RAY; BHUNIA, 2014). Tratam-se de bastonetes gram-positivos com variadas formas e tamanhos, encontradas individualmente ou formando cadeias (RAY; BHUNIA, 2014). As espécies de *Bifidobacterium* são consideradas bactérias ácido lácticas e heterofermentativas, sem motilidade, não formadores de esporos e anaeróbicos, embora alguns possam tolerar O₂ (FORSYTE 2013; RAY; BHUNIA, 2014).

A temperatura de crescimento das espécies de *Bifidobacterium* é de 25 °C a 45 °C, com temperatura ótima na faixa de 37 °C a 41 °C, com pH ótimo de 6,0 a 7,0, não crescendo em pH acima de 8,0 ou abaixo de 4,5 (SHAH, 2007; RAY; BHUNIA, 2014). Esses microrganismos fermentam glicose e produzem ácidos láctico e acético, sem produzir CO₂, mas também possuem a capacidade de fermentar lactose, galactose e algumas pentoses (RAY; BHUNIA, 2014).

Dentre as espécies mais conhecidas estão *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium* e *Bifidobacterium adolescentis* (SHAH; LANKAPUTHRA, 2002; RAY; BHUNIA, 2014), sendo que a maioria das espécies habita o trato intestinal dos mamíferos (FORSYTE, 2013). *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium longum* são encontradas em humanos adultos (SHAH; LANKAPUTHRA, 2002).

Shah (2007) e Ray e Bhunia (2014) salientam que em seres humanos as bactérias do gênero *Bifidobacterium* sp. são encontradas no intestino grosso e estão presentes em grande número nas fezes de lactentes dentro de 2 a 3 dias após o nascimento e em bebês em fase de lactação.

Nesse sentido, Trabulsi e Alterthum (2015) destacam os resultados

promissores obtidos pelo uso de *Bifidobacterium* sp. tanto de maneira preventiva como terapêutica, com o uso dos prébióticos e probióticos em produtos e alimentos que visam modular de maneira benéfica a microbiota intestinal. Assim, algumas espécies podem ser adicionadas a produtos lácteos visando fornecer células vivas em grande número para restaurar e manter a saúde intestinal em humanos, já que produzem bacteriocinas e podem desempenhar papel importante no controle de patógenos durante a colonização do intestino (RAY; BHUNIA, 2014).

Os lactobacilos e as bifidobactérias são os microrganismos probióticos mais importantes sob investigação porque são reconhecidos como parte da microbiota intestinal humana e têm sido ingeridos de maneira segura em alimentos (FORSYTHE, 2013).

3.4 Microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos

Os microrganismos indicadores em alimentos são estabelecidos pela Instrução Normativa nº 161 de 01 de julho de 2022, a qual inclui para leites fermentados a determinação de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras (BRASIL, 2022). Essas análises são importantes para garantir a segurança alimentar dos produtos através dos limites legais de contagem microbiana, e são previstas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) corresponde ao órgão responsável pelo registro dos produtos de origem animal (leite, ovos, carnes e mel) e possui suas próprias diretrizes, tanto sob aspecto microbiológico quanto físico-químico. Porém, cabe a ANVISA a fiscalização de todos os alimentos, de origem animal ou vegetal.

Inicialmente salienta-se a importância da diferenciação dos microrganismos deteriorantes dos patogênicos, já que os produtos alimentícios podem ser por eles contaminados (MATEJČEKOVÁ *et al.*, 2019).

Os agentes microbianos deteriorantes, na maioria das vezes, fazem parte da microbiota natural do alimento e, portanto, são, em sua maioria, inofensivos à saúde humana, mas promovem alterações sensoriais de cor, sabor, odor e/ou textura no alimento (RIBEIRO *et al.*, 2018).

A deterioração pela atividade microbiana envolve muitos mecanismos e impacta diretamente na aceitação dos produtos pelos consumidores, seja devido ao crescimento visível de colônias de microrganismos, alterações na textura provenientes

da degradação de proteínas, carboidratos e lipídios ou percepção de odores e sabores desagradáveis (BARBA *et al.*, 2017). Também causa perdas econômicas, danos à reputação e punições de acordo com a lei para a indústria alimentícia (BARBA *et al.*, 2017; MATEJČEKOVÁ *et al.*, 2019).

Os microrganismos patogênicos resultam da contaminação dos alimentos, principalmente por meio de condições inadequadas de higiene durante o processo de produção (RIBEIRO *et al.*, 2018). Prejudica a segurança dos alimentos por corresponder a um risco para a saúde dos consumidores já que sua ingestão pode ocasionar doenças de origem alimentar (BARBA *et al.*, 2017; MATEJČEKOVÁ *et al.*, 2019).

Entretanto, ao serem considerados os microrganismos patogênicos, deve-se estabelecer os conceitos de infecções, intoxicações e toxinfecções alimentares.

As infecções alimentares são caracterizadas pela ingestão de microrganismos que invadem o hospedeiro e se multiplicam no trato intestinal humano causando doenças, como é o caso da *Salmonella* sp., do *Campylobacter* sp. e das *E. coli* patogênicas (FORSYTE, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2018).

As intoxicações alimentares ocorrem devido a ingestão de toxinas produzidas por microrganismos em que os tratamentos térmicos não são eficazes, como é o caso do *Bacillus cereus*, do *Staphylococcus aureus* e do *Clostridium botulinum* (FORSYTE, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2018). Nas toxinfecções os microrganismos e sua toxina causam doenças, sendo que estes podem ou não serem produzidos dentro do hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 2018).

As infecções e intoxicações alimentares são consideradas as causas mais comuns de doenças transmitidas por alimentos e são uma preocupação tanto para os consumidores quanto para a indústria (AZIMAN *et al.*, 2014), o que justifica a prevenção e/ou inibição do crescimento microbiano nos produtos alimentícios.

3.4.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* predomina entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais endotérmicos (MELO FRANCO; LANDGRAF, 2008; ODONKOR; AMPOFO, 2013). Pertence à família *Enterobacteriaceae* e é classificada como bacilo gram negativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, não esporulados, capazes de fermentar lactose e

glicose com produção de ácido e gás, embora alguns sejam anaerogênicos (MELO FRANCO; LANDGRAF, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; FORSYTE, 2013; GAASTRA *et al.*, 2014).

A maioria dos sorovares de *E. coli* não são patogênicos e fazem parte da microbiota intestinal normal de seres humanos (cerca de 6 Log organismos/g), sendo que colonizam o trato gastrintestinal de bebês em poucas horas após o nascimento. A presença da população dessas bactérias no intestino reduz a multiplicação de bactérias prejudiciais, além de serem importantes para a síntese de vitamina B. Esse microrganismo costuma ser inofensivo quando confinado no lúmen intestinal (FORSYTE, 2013).

Por outro lado, a *E. coli* é utilizada como microrganismo indicador de contaminação de origem fecal em água, matéria-prima e alimentos (FORSYTE, 2013; ODONKOR; AMPOFO, 2013). Porém, o significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliado sob dois ângulos. Primeiramente, ao ser detectada no alimento, indica que este apresenta contaminação microbiana de origem fecal e que portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias (MELO FRANCO; LANDGRAF, 2008; YANG; YOON, 2022). O segundo aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem (MELO FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As cepas patogênicas de *E. coli* são divididas de acordo com os sintomas clínicos, mecanismos de patogenicidade, períodos de incubação, duração da enfermidade e virulência (FORSYTE, 2013). Desse modo Forsyte (2013, p. 221 a 223) destaca os seis grupos de *E. coli* reconhecidos como patogênicos:

- *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC): causa diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (HUS). Esse grupo inclui a *E. coli* produtora de shigatoxina (...)
- *E. coli* enterotoxigênica (ETEC): comumente conhecida como causadora da diarreia dos viajantes (...) causa diarreia aquosa (...) e produz febres baixas. O microrganismo coloniza a parte proximal do intestino delgado.
- *E. coli* enteropatogênica (EPEC): (...) causa vômitos, febre e diarreia aquosa contendo muco (...). O microrganismo coloniza as microvilosidades de todo o intestino e produz a lesão característica de adesão e desaparecimento (...).
- *E. coli* enteroagregativa (EAggEC): causa diarreia aquosa persistente, sobretudo em crianças, durando mais de 14 dias (...) produzem uma toxina termossensível, relacionada antígenicamente a hemolisina, mas que não é hemolítica, e uma toxina termoestável (...) sem qualquer relação com a enterotoxina termoestável da ETEC (...).
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): causa febre e diarreias profusas contendo muco e sangue. O microrganismo coloniza o colo (...).

- *E. coli* difusamente adesiva (DAEC): tem sido associada com diarreia em alguns estudos, mas não de forma consistente.

Com base no exposto, justifica-se o interesse por alternativas que possam reduzir ou eliminar a microbiota indesejável dos alimentos, sejam estas deteriorantes ou patogênicas. Desse modo espera-se garantir a segurança alimentar dos consumidores e, conseqüentemente, reduzir os riscos de desenvolvimento de doenças pela população.

3.4.2 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, onde também estão incluídos patógenos como *E. coli*, *Yersinia* sp. e *Shigella* sp. (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2018; JANDA; ABBOTT, 2021; PERROTO *et al.*, 2021). São classificados como bacilos gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produzem ácido e gás a partir de glicose, incapazes de metabolizar lactose e sacarose, capazes utilizar citrato como única fonte de carbono, maioria móvel devido a presença de flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum* (MELO FRANCO; LANDGRAF, 2008; EZAKI, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; PERROTO *et al.*, 2021).

Os microrganismos do gênero *Salmonella* sp. variam de 0,7 a 1,5 µm de diâmetro e 2 a 5 µm de comprimento. Não produzem oxidase, indol, acetoina e não hidrolisam ureia, porém, produzem catalase, sulfeto de hidrogênio e apresentam capacidade de descarboxilar lisina e ornitina. A temperatura ótima de multiplicação é 38 °C (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Existem apenas duas espécies de *Salmonella* sp., a *Salmonella enterica* e a *Salmonella bongori*, que são divididas em oito grupos. Porém, existem mais de 2.400 sorotipos (ou sorovares) que são utilizados como base para a nomenclatura desse microrganismo. Assim, ocorreu renomeação de algumas cepas, com por exemplo a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, antes conhecida como *Salmonella typhimurium*, que era de fato um sorovar da espécie *Salmonella enterica* (FORSYTE, 2013; JANDA; ABBOTT, 2021). Apesar de todos os sorovares serem considerados patógenos humanos, somente cerca de 200 tem sido associados a doenças em humanos (FORSYTE, 2013).

As salmonelas estão presentes no ambiente, água potável e alimentos devido

a contaminação por fezes de indivíduos doentes ou portadores. Infectam os seres humanos e praticamente todos os animais domésticos e selvagens, incluindo pássaros, répteis e insetos. No homem, as salmonelas causam vários tipos de infecção, sendo as mais comuns a gastroenterite e a febre tifoide (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; JANDA; ABBOTT, 2021).

A maioria das infecções humanas por *Salmonella* sp. deve-se a transmissão de origem alimentar a partir de carne e de produtos lácteos (BIDOL *et al.*, 2007; FORSYTE, 2013; JANDA; ABBOTT, 2021). A *Salmonella* sp. consegue sobreviver a baixa atividade de água e alto conteúdo de gordura, os quais ajudam na proteção do microrganismo durante o trânsito pelo estômago (FORSYTE, 2013). Portanto, é essencial que práticas higiênicas sejam observadas durante a manipulação e processamento dos alimentos visando reduzir sua contaminação.

O controle de *Salmonella* sp. nos alimentos ocorre por meio de inúmeras exigências, onde a legislação estabelece ausência (< 1 célula de *Salmonella* em 25 g de produto) em produtos prontos para o consumo, como é o caso de leites fermentados (BRASIL, 2022).

3.5 Aditivos naturais em alimentos

Os aditivos alimentares tratam-se de substâncias químicas que ao serem incorporadas aos alimentos conferem melhorias em suas características, desempenhando assim um papel crucial no processo de produção (CAROCHO *et al.*, 2014; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018; MARTINS; SENTANIN; SOUZA, 2019; NOGUEIRA, 2020; ZANG *et al.*, 2022). Apresentam a finalidade de impedir alterações e manter, conferir ou intensificar características sensoriais, além de modificar ou preservar o estado físico do alimento em que foi adicionado sem afetar seu valor nutritivo (LACHNO *et al.*, 2019).

Os aditivos são classificados de acordo com suas funcionalidades específicas, mas seu uso está atrelado a legislação de cada país e sua política de segurança alimentar (CAROCHO *et al.*, 2014; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018; MARTINS; SENTANIN; SOUZA, 2019; NOGUEIRA, 2020).

Existem aditivos naturais, que podem estar presentes no próprio alimento ou serem oriundos de uma fonte natural e, também os sintéticos, que são definidos como substâncias produzidas artificialmente (NOGUEIRA, 2020; ZEECE, 2020). Estes

últimos, devido ao custo, facilidade na utilização e elevada estabilidade química, são amplamente empregados na indústria (NOGUEIRA, 2020). Porém, devido a fatores como toxicidade, problemas alergênicos, danos ao fígado e carcinogênese, associados aos aditivos sintéticos, os à base de vegetais e microrganismos vem se destacando (MEENAKSHI *et al.*, 2009; ALENISAN *et al.*, 2017; LACHNO *et al.*, 2019; NOGUEIRA, 2020; ZANG *et al.*, 2022).

Assim, com a crescente busca por alimentos saudáveis entre os consumidores, os aditivos naturais estão sendo alvo de pesquisas e uma alternativa de grande interesse para a indústria alimentícia (CALDAS, 2014; LACHNO *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a adição de antioxidantes à base de plantas em alimentos lácteos mostrou-se eficaz no retardo da oxidação desses produtos, por controlar a formação de radicais livres e aumentar sua capacidade antioxidante, o que prolonga sua vida útil (MEENAKSHI *et al.*, 2009; ALENISAN *et al.*, 2017; YANGILAR; YILDIZ, 2018; LACHNO *et al.*, 2019). Yangilar e Yildiz (2018) e Benguedouar *et al.* (2022) destacam que é crescente o interesse em preservar os produtos lácteos de microrganismos indesejáveis por meio do uso de conservantes naturais.

Zang *et al.* (2022) salientam que é necessário o fomento de novas pesquisas com intuito de aperfeiçoar métodos de obtenção de aditivos naturais associados à segurança, eficácia, funcionalidade e custo desses produtos, com o objetivo de garantir a segurança alimentar do consumidor, levando a inovação e oportunizando a criação de novas formulações lácteas a serem desenvolvidas pelas indústrias de alimentos.

3.6 Café

O café é uma das bebidas mais populares do mundo devido aos seus efeitos energizantes, qualidade sensorial e implicações positivas na saúde humana (ATTOKARAN, 2017; SHAZLY *et al.*, 2022). Possui propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antimutagênicas e anti-inflamatórias, o que justifica seu uso em formulações farmacológicas. Atua na redução do risco de diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas como mal de Alzheimer e de Parkinson (PREEDY, 2015; SALES *et al.*, 2020). Além disso, o café estimula o desempenho cerebral como consequência do teor de cafeína (HARIADI *et al.*, 2022).

O grão do café é oriundo do cafeeiro, uma planta da Classe Eudicotyledoneae das Angiospermas, Família Rubiaceae e pertencente ao gênero *Coffea* (CARVALHO, 1946; BRIDSON, 1987), que possui 130 espécies catalogadas na literatura (DAVIS; RAKOTONASOLO, 2021). Destes, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* têm maior importância econômica (INCAPER, 2019).

O *Coffea canephora*, conhecido comercialmente como Robusta ou Conilon, é a segunda espécie mais produzida no mundo, sendo que o Brasil responde por aproximadamente 20% da produção mundial (VIEIRA, *et al.* 2019; PEREIRA *et al.*, 2021). Essa espécie é conhecida por apresentar baixa acidez, um sabor mais forte e amargo além de conter alto teor de compostos bioativos como os derivados de ácido clorogênico e cafeína (RINCON, 2011; YILMAZ; ACAR-TEK; SÖZLÜ, 2017; CURTI *et al.*, 2020).

Em alguns países o café comercial torrado e moído geralmente consiste apenas de *C. arabica* ou de uma mistura com pequena percentagem de *C. canephora* (FARAH, 2012; PREEDY, 2015). Por outro lado, em algumas localidades utiliza-se uma alta percentagem de *C. canephora* ou somente ele para produção de café solúvel, devido ao rendimento de maior quantidade de sólidos solúveis na bebida (FARAH, 2012; PREEDY, 2015). Isso explica os maiores teores de cafeína frequentemente observados em cafés solúveis produzidos em alguns países, como o Brasil, por exemplo (FARAH, 2012; PREEDY, 2015). Em países produtores de *C. canephora*, como a Indonésia, essa espécie também é utilizada para café comercial torrado e moído (FARAH, 2012; PREEDY, 2015). Entretanto, o café canéfora é mais utilizado pela indústria de café solúvel (QOSIMAH *et al.* 2021).

O Brasil é o maior produtor de grãos de café do planeta (VARGAS-HERNÁNDEZ; RUIZ, 2021). Trata-se de uma importante cultura em que os grãos são colhidos, torrados e comercializados, e por isso correspondem a fonte de subsistência para milhões de pequenos agricultores e trabalhadores (PEREIRA *et al.*, 2021). Além do consumo nacional, no acumulado dos quatro primeiros meses de 2023, a exportação brasileira de café somou 11,2 milhões de sacas de 60 Kg (CONAB, 2023).

O café é produzido a partir do processamento e extração dos grãos de café. Durante sua produção passa pelas etapas de secagem, torrefação, moagem (café em pó e solúvel) e embalagem (HARIADI *et al.*, 2022). Na torrefação espera-se obter sabor, cor e aroma característicos, sendo que nessa etapa, o tempo de torra pode aumentar o amargor, reduzir a acidez e alterar o sabor do grão (HARIADI *et al.*, 2022).

O processo de torra do café apresenta função importante para a definição dos atributos sensoriais do produto, já que aumentando-se sua intensidade, a cor torna-se mais escura e o sabor mais forte (ITC, 2011; PREEDY, 2015). Mudanças significativas ocorrem na composição química do café durante essa etapa, onde algumas substâncias são degradadas e outras interagem para formar novas, o que também influencia a potencial bioatividade alimentar do café (LIVRAMENTO *et al.*, 2017). Por esse motivo, o café é um dos alimentos que mais sofrem alterações durante o processamento (PREEDY, 2015).

Durante a torrefação diferentes compostos encontrados nos grãos de café verde são degradados e transformados, o que diminui a quantidade de carboidratos e ácidos clorogênicos e promove a produção de melanoidinas e compostos fenólicos, resultantes da reação de *Maillard* que ocorre durante esse processo (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009; PASTORIZA; RUFÍAN-HENARES, 2014; PREEDY, 2015; CONTRERAS-CALDERÓN *et al.*, 2016).

Curti *et al.* (2020) afirmam que o café é a bebida mais rica em ácidos clorogênicos, sendo que 100 mL de café expresso pode conter entre 24 e 423 mg desses polifenóis, entretanto, a torrefação drástica pode levar à perda de 95% dos ácidos clorogênicos.

Dentre os compostos fenólicos presentes no grão de café além do ácido clorogênico, podem ser destacados o ácido ferúlico, o ácido vanílico e fitoquímicos (CLIFFORD, 1985; REMPE *et al.*, 2017). Outros bioativos como a teobromina, teofilina, diterpenos (ou seja, cafestol e *kawool*) e micronutrientes, como magnésio, potássio e vitamina B3 e derivados da trigonelina (antes do processo de torrefação) também fazem parte de sua composição (CURTI *et al.*, 2020). Porém, as concentrações desses compostos dependem de fatores como variações na planta (espécie, origem e características genéticas), cultivo e técnicas de colheita, condições de armazenamento, grau e tipo de torrefação (CURTI *et al.*, 2020).

Nesse sentido, é importante frisar que a qualidade do café está diretamente relacionada às propriedades físicas, físico-químicas e químicas, responsáveis pela característica e aparência do grão torrado, do sabor e aroma das bebidas, tais como componentes voláteis e fenólicos (principalmente ácidos clorogênicos), ácidos graxos, proteínas e algumas enzimas (AGNOLETTI, 2015; YEAGER *et al.*, 2023).

Shazly *et al.* (2022) afirmam que o extrato de café pode ser usado como aromatizante em doces cozidos, balas, sorvetes, bebidas maltadas, licores e

preparações lácteas. Já outros autores destacam o uso de extrato de café como agente antimicrobiano, mesmo ainda sendo pouco conhecida a maneira de atuação das substâncias por ele liberadas sobre os microrganismos (RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; ALVAREZ; MOREIRA; PONCE, 2012; OESTREICH-JANZEN, 2013).

3.6.1 Composição e propriedades do café

O composto bioativo mais abundante em grãos de café é a cafeína ou 1,3,7-trimetilxantina, um alcaloide de grande importância no que diz respeito às propriedades fisiológicas e na determinação do caráter amargo do café (PREEDY, 2015). É moderadamente solúvel em água e passa facilmente pelas membranas biológicas por difusão passiva, sendo rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal em seres humanos (PREEDY, 2015).

A cafeína possui diferentes atividades biológicas, como estimulação do sistema nervoso central devido a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, estimulação miocárdica e vasoconstrição periférica (RIEDEL *et al.*, 2014; MANCINI; WANG; WEAVER, 2018).

O teor de cafeína pode variar entre os cafés, já que depende do tipo de grão de café (*Coffea arabica* ou *Coffea canephora*), método de torrefação (torra clara ou torra escura) e método de extração (gotejamento ou fervura) empregados (MANCINI; WANG; WEAVER, 2018). Entretanto, durante a torrefação, não há perda significativa em termos de cafeína. Para sementes torradas de *C. arabica* os teores de cafeína variam entre 0,7 e 1,6 g/100 g enquanto para *C. canephora* variam entre 1,8 e 2,6 g/100 g (PAULA; FARAH, 2019).

Outros compostos bioativos como os ácidos clorogênicos (CGA), estão presentes no café. Os CGAs correspondem a uma família de ésteres formados entre o ácido quínico e certos ácidos transcinâmicos, mais comumente os ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico (PREEDY, 2015). Os CGAs mais abundantes nos grãos de café são isômeros dos ácidos cafeoilquínicos: ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-O-cafeoilquínico (4-CQA) e ácido 3-O-cafeoilquínico (3-CQA) (PREEDY, 2015).

Como outros polifenóis, os ácidos clorogênicos contribuem com as propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, antipiréticas, antineoplásicas, hepatoprotetoras e neuroprotetoras do café (JANG *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2015;

PREEDY, 2015; NAVEED *et al.*, 2018). Além disso, podem ajudar na prevenção de degeneração da retina, obesidade, diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares e ainda modular o metabolismo lipídico e a glicose em pessoas saudáveis e nas que sofrem de doenças genéticas relacionadas a distúrbios metabólicos (JANG *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2015; PREEDY, 2015; NAVEED *et al.*, 2018).

Porém, os ácidos clorogênicos sofrem redução durante o processo de torrefação, pois ocorrem alterações entre os grupos redutores de açúcares e os grupos amino livres de proteínas ou aminoácidos, originando as melanoidinas e outros compostos (VIGNOLI *et al.*, 2014). Melanoidinas correspondem a um grupo heterogêneo de polímeros contendo nitrogênio e são produzidas durante o processo de torrefação nas últimas etapas da reação de *Maillard*, portanto, não estão presentes no café verde (PREEDY, 2015). Conferem ao café coloração marrom por absorverem luz em comprimentos de onda elevados, como 420 nm (PREEDY, 2015).

As melanoidinas têm sido associadas tanto a propriedades antioxidantes quanto a benefícios para a saúde como, por exemplo, atividade anti-inflamatória, anticarcinogênica, anticariogênica, anti-hipertensiva ou prebiótica (MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017; OPITZ *et al.*, 2017). Por outro lado, as melanoidinas podem ser utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio pela microflora do intestino, auxiliando no crescimento de bifidobactérias, exercendo atividade prebiótica e modulando a população bacteriana do cólon (BORRELLI; FOGLIANO, 2005; JIMÉNEZ-ZAMORA; PASTORIZA; RUFÍAN-HENARES, 2015).

Nesse sentido é importante frisar que dentre as propriedades mais estudadas do café está sua atividade antioxidante, relacionada a compostos naturais, como cafeína e ácidos clorogênicos e, produtos da reação de *Maillard*, como melanoidinas, redutonas, furano, pirróis e maltol (FUSTER *et al.*, 2000; YANAGIMOTO *et al.*, 2004; DEL CASTILLO; GORDON; AMES, 2005; KHAN; MAALIK; MURTAZA, 2016; SALES *et al.*, 2020).

Os antioxidantes são capazes de doar elétrons para reduzir o excesso de radicais livres, que são espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) constantemente formadas no interior das células (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; PREEDY, 2015). Se os radicais livres excedem a capacidade da célula de regulá-los, ocorre uma condição conhecida como estresse oxidativo, especialmente nas membranas celulares (LOBO *et al.*, 2010). O dano oxidativo altera o grau de fluidez das membranas prejudicando sua integridade além de inativar

receptores e enzimas a ela ligados, o que aumenta sua permeabilidade e prejudica a função celular normal (QOSIMAH *et al.*, 2021). Portanto, os antioxidantes previnem e reparam os danos causados pelos radicais livres (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

Contudo, apesar da cafeína, o ácido clorogênico e as melanoidinas já serem conhecidos por apresentarem potencial antioxidante, também foram identificados efeitos desses compostos na inibição do crescimento de vários microrganismos (MUTTAQIN; HADI; MAGHFIRAH, 2022).

Pesquisadores como Oestreich-Janzen (2013) e Langner e Rzeski (2013) estudaram os efeitos benéficos do café na saúde humana, com foco na composição dos extratos e na exploração da sua capacidade antioxidante, antibacteriana, anticâncer e desintoxicante. Langner e Rzeski (2013) e Monente *et al.* (2014) verificaram que extratos de café apresentam ação antimicrobiana sobre microrganismos patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos, a exemplo da *Salmonella* sp. e *E. coli*. Porém, o controle microbiano pode ocorrer por atividade bactericida ou bacteriostática com atuação na estrutura celular, no mecanismo de comunicação microbiana ou por mecanismos de ação ainda não elucidados (BURT *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016; MANCINI; WANG; WEAVER, 2018; RANTE *et al.*, 2021).

Assim, considerando-se todo esse exposto espera-se identificar a atividade de extrato de café sobre microrganismos. Acredita-se que o uso de produtos vegetais, como é o caso do café, se constitui em uma alternativa promissora para utilização a nível industrial, seja pela diversidade de aplicações, como por exemplo em alimentos lácteos funcionais, ou pela facilidade de incorporação em matrizes alimentares, por corresponder a um ingrediente natural que pode trazer benefícios ou devido as características sensoriais bem conhecidas do café, associado a seu potencial de inibição sobre agentes deteriorantes e patogênicos (KALSCHNE *et al.*, 2014; SINGH, 2018).

Além disso, espera-se que os extratos de café possam manter a atividade das culturas iniciadoras e probióticas em iogurte, uma vez que conforme Canci *et al.* (2022), estes extratos não afetam o crescimento microbiano destas bactérias, enquanto retardam ou inibem a atividade biológica de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima e microrganismos

As matérias-primas utilizadas para a elaboração dos iogurtes foram: leite de vaca pasteurizado integral (Lactobom®); leite em pó desnatado (Molico - Nestlé®); açúcar cristal (Alto Alegre®); cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Danisco YO-MIX® 883 LYO 50DCU); culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (Danisco HOWARU®DOPHILUS LYO 10DCU-S) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (SACCO Lyofast BLC 1®); café canéfora torrado (Iguaçu®).

Os microrganismos contaminantes *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888 são oriundas de coleção da *American Type Culture Collection* (ATCC).

A elaboração das formulações de iogurte e as análises para determinação da composição química, propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram realizadas nas dependências dos Laboratórios de Pesquisa e de Ensino da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) - Campus Medianeira.

4.2 Obtenção e caracterização do extrato de café

O extrato de café utilizado foi obtido a partir de grãos torrados de café canéfora (*Coffea canephora*). Seu processamento ocorreu em uma planta piloto industrial localizada em Cornélio Procópio-PR, sendo amostras submetidas à extração convencional em colunas de bateria. Durante esse processo, o vapor de água (180 °C) foi introduzido no primeiro estágio até atingir o último, para que o extrato atingisse o café recentemente carregado. Na coluna final o café foi extraído a uma temperatura inferior a 100 °C sendo posteriormente submetido a secagem por atomização (CANCI *et al.*, 2022).

Foi utilizado o extrato de café canéfora torrado na concentração de 5% (m/m), pois Canci *et al.* (2022) alcançaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana sobre microrganismos indesejáveis em alimentos nessa concentração.

Na caracterização do extrato de café canéfora torrado realizada por Canci *et al.* (2022) foram determinados o teor de cafeína, ácido-5-cafeiolquínico (5-ACQ),

melanoidinas, luminosidade, tonalidade cromática (h°) e pH.

Para determinação de cafeína e ácido-5-cafeiolquínico amostras do extrato (diluídas em solução de ácido acético 5,0%) foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC; Ultimate 3000, Thermo Scientific, Germering, Alemanha) com coluna C18 Acclaim TM Polar advantage II (150 mm x 4.6, 3 μ m, 120 A) (Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha) e eluição gradiente com fluxo de 0,6 mL/min, sendo utilizada para detecção da cafeína 272 nm e para o ácido-5-cafeiolquínico a 320 nm (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016).

As melanoidinas do extrato foram estimadas de acordo com Corso, Vignoli e Benassi (2016), onde amostras do extrato de café foram ressuspendidas em água com concentração de 0,57 mg/mL para a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) além da leitura do pH (PG 1800, Gehaka, São Paulo, Brasil). Para luminosidade e tonalidade cromática amostras do extrato foram maceradas em almofariz com posterior leitura em colorímetro (CR400, Konica Minolta, Osaka, Japão) (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016).

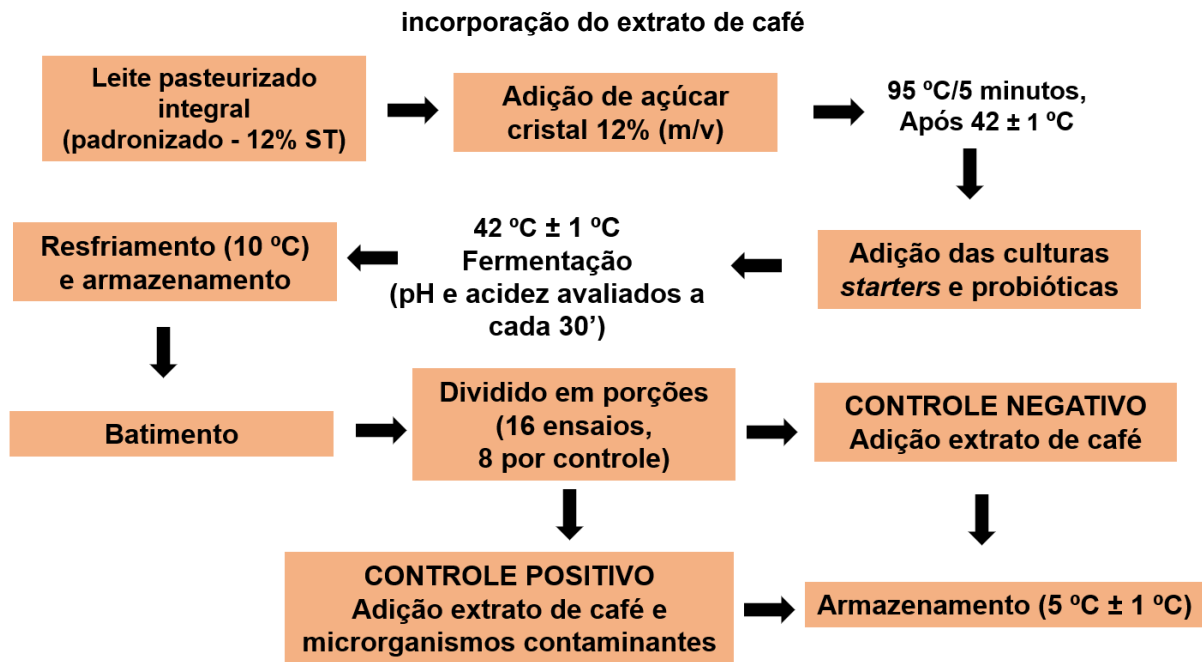
Os resultados encontrados foram de 3,30 g/100 g para cafeína; 0,67 g/100 g para o teor de ácido-5-cafeoilquínico; 0,686 AU para melanoidinas; 4,65 para o pH e; 40,00 e 71,32 para luminosidade e tonalidade cromática, respectivamente (CANCI *et al.*, 2022).

4.3 Produção do iogurte probiótico e incorporação do extrato de café

A produção do iogurte batido contendo os microrganismos probióticos e o extrato de café foi realizada conforme descrito na Figura 1 e de acordo com o procedimento adaptado de Bai *et al.* (2020).

Para cada formulação foi utilizado leite pasteurizado integral, padronizado em 12% (m/v) de sólidos totais por meio da adição de leite em pó desnatado e adicionado de açúcar cristal 12% (m/v). A mistura foi submetida a um tratamento térmico (95 ± 1 °C/5 minutos) (BAI *et al.*, 2020) e resfriada até 42 ± 1 °C.

Figura 1 - Estratégia experimental para produção dos ensaios do iogurte probiótico e



Fonte: Autoria própria (2023)

Posteriormente, foi adicionada a cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,1 g/L) e as culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (0,2 g/L) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (0,01 g/L), seguindo as recomendações dos fabricantes.

As formulações foram incubadas a 42 ± 1 °C para fermentação, sendo que para avaliação do tempo de fermentação, amostras foram retiradas a cada 30 minutos e avaliadas em relação ao pH (até próximo a pH $4,60 \pm 0,05$) e acidez titulável expressa em ácido láctico (mínima de 0,60 g de ácido láctico/100g de iogurte). Ao final dessa etapa, os iogurtes foram resfriados (refrigerador) até temperatura de 10 °C (± 1 °C), sendo então batidos lentamente de forma manual.

Por fim, os iogurtes foram divididos em porções (150 g) e acondicionados em frascos com tampa para o preparo dos controles negativo e positivo, conforme Tabela 1.

Para a formulação do controle negativo adicionou-se extrato de café 5% (5 g/100 g) nos ensaios 2, 4, 6 e 8 (conforme Tabela 1). No controle positivo adicionou-se extrato de café (5%) nos ensaios 2, 4, 6 e 8 e cepas contaminantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888 em todos os oito ensaios (conforme Tabela 1).

Sequencialmente os iogurtes dos controles negativo e positivo foram

armazenados sob refrigeração (5 ± 1 °C).

Tabela 1 - Formulações dos ensaios para produção do iogurte probiótico e incorporação dos extratos de café

Ensaio	Composição	Controle Negativo (-) ^b	Controle Positivo (+) ^c
1	Padrão (cultura <i>starter</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	P ⁻	P ⁺
2	Padrão + extrato de café canéfora (5,0%) ^a	PEC ⁻	PEC ⁺
3	Padrão + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	PLa ⁻	PLa ⁺
4	Padrão + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + extrato de café canéfora (5,0%) ^a	PLaEC ⁻	PLaEC ⁺
5	Padrão + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PBal ⁻	PBal ⁺
6	Padrão + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + extrato de café canéfora (5,0%) ^a	PBalEC ⁻	PBalEC ⁺
7	Padrão + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PLaBal ⁻	PLaBal ⁺
8	Padrão + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> + extrato de café canéfora (5,0%) ^a	PLaBalEC ⁻	PLaBalEC ⁺

^a CANCI *et al.* (2022).

^b Controle negativo (-): ensaios sem adição de cepas contaminantes de *Salmonella* entérica sorovar *Typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888.

^c Controle positivo (+): ensaios com adição de cepas contaminantes de *Salmonella* entérica sorovar *Typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888.

Fonte: Autoria própria (2023)

4.3.1 Ativação e padronização das cepas contaminantes

Os microrganismos utilizados para contaminação do controle positivo foram cepas de microrganismos Gram-negativos *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888. As culturas bacteriológicas foram mantidas em bisel de ágar nutriente sob refrigeração (5 ± 3 °C) até ativação em caldo de crescimento específico.

Para ativação dos microrganismos foram inoculadas alçadas de cultura bacteriana em tubos de ensaio individuais contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) estéril. Realizou-se então a incubação por 12 h em estufa bacteriológica a 35 ± 1 °C.

Após a ativação, as suspensões bacterianas foram padronizadas de modo a obter uma contagem de 10^3 UFC/mL. Para tanto, repicou-se a suspensão do caldo BHI em solução salina de peptona (8,5 g/L de cloreto de sódio; 10 g/L de peptona; 1 L água destilada) até que fosse atingida a turvação correspondente a 0,5 na escala McFarland. Posteriormente realizou-se as diluições seriadas até que fosse atingida a contagem 10^3 UFC/mL.

Para contaminação das amostras do controle positivo adicionou-se 1 mL da contagem 10^3 UFC/mL de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* e 1 mL da diluição

10^3 UFC/mL de *Escherichia coli* em 100 g de iogurte. Essa contagem foi estabelecida de acordo com os limites máximos preconizados pela Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022 (BRASIL, 2022) para leites fermentados.

4.4 Acompanhamento do crescimento microbiano

A avaliação do crescimento microbiano das culturas *starters* e probióticas foi realizada por contagem em placas onde foram utilizados ágar M17 para *Streptococcus thermophilus* (SACCARO *et al.*, 2011); ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com pH 4.58 para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (THARMARAJ; SHAH, 2003; ASHRAF; SHAH, 2011); ágar MRS adicionado de solução de D-sorbitol para *Lactobacillus acidophilus* (DAVE; SHAH, 1996; ASHRAF; SHAH, 2011); ágar MRS com L-cisteína, cloreto de lítio e propionato de sódio para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (LAPIERRE; UNDELAND; COX, 1992; KAILASAPATHY, 2006; CASTEELE *et al.*, 2006).

Ainda, conforme estabelecido pela Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022 (BRASIL, 2022), foi realizado o acompanhamento do crescimento de *Escherichia coli* (FDA, 1998) *Salmonella* sp. (ISO, 2014) e bolores e leveduras (DA SILVA *et al.*, 2017) por meio da contagem em placas.

As inoculações em placas de todos os microrganismos foram realizadas em triplicata no tempo zero e a cada 7 dias de armazenamento refrigerado, até atingir 42 dias (T1 = 1 dia, T2 = 7 dias, T3 = 14 dias, T4 = 21 dias, T5 = 28 dias, T6 = 35 dias, T7 = 42 dias). A incubação ocorreu em condições de temperatura e aerobiose/anaerobiose específicas para cada microrganismo. Posteriormente foi realizada a contagem das colônias e os resultados expressos em log UFC/g.

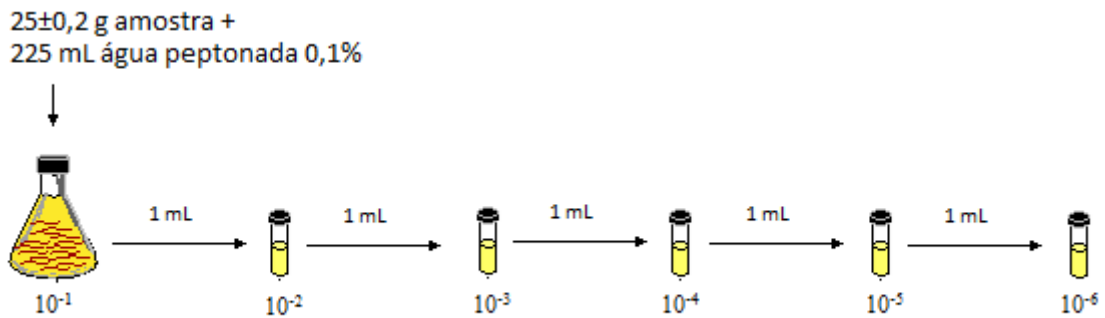
4.4.1 Metodologias das análises microbiológicas

4.4.1.1 Preparo das diluições decimais seriadas

Foram pesadas 25 g de amostra que foram adicionadas a 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). A partir desta solução foram realizadas as diluições sucessivas até 10^{-6} ou conforme o microrganismo analisado: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* diluições 10^{-4} a 10^{-6} ; *Escherichia coli* diluições 10^{-1} a 10^{-3} ; *Salmonella* sp. diluições 10^{-1} a 10^{-5} ; bolores e leveduras diluições 10^{-1} a 10^{-5} (Figura 2).

Figura 2 - Esquema da retirada da unidade analítica e preparação das diluições decimais seriadas para realização das análises microbiológicas



Fonte: Autoria própria (2023)

4.4.1.2 Enumeração de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

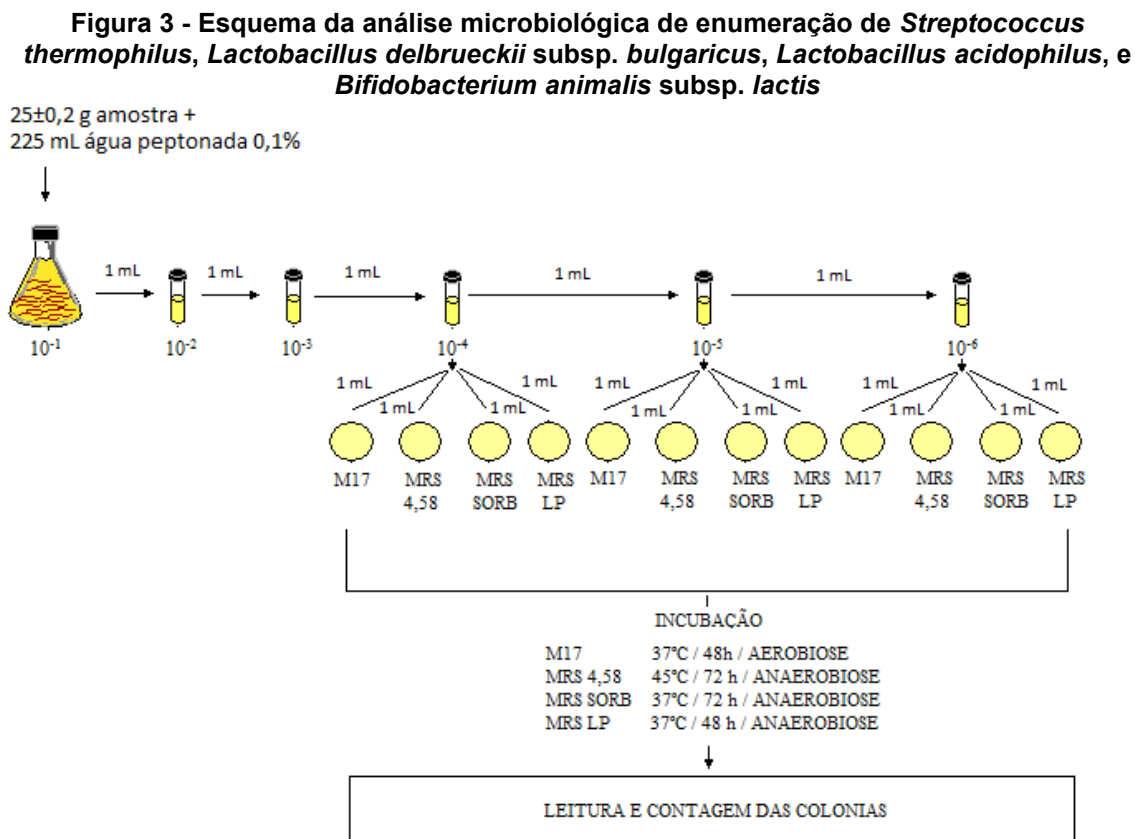
Para enumeração de *Streptococcus thermophilus* realizou-se a semeadura em profundidade (1 mL) das diluições da amostra (10^{-4} a 10^{-6}) em placas de Petri estéreis, conforme Figura 3. Em seguida adicionou-se o Ágar M17 fundido e esperou-se a solidificação. As placas foram incubadas a temperatura de 37 °C por 48 horas sendo logo após realizada a contagem das colônias (UFC/g). Seguiu-se a metodologia descrita por Saccaro *et al.* (2011).

Na enumeração de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* realizou-se a semeadura em profundidade das diluições da amostra (10^{-4} a 10^{-6}) em placas de Petri estéreis e adicionou-se Ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com pH 4.58. Ajustou-se o pH do meio com ácido clorídrico (HCl) a 1,0 M. Incubou-se as placas em condições anaeróbicas a temperatura de 45 °C por 72 horas, conforme Figura 3. Realizou-se a contagem das colônias (UFC/g). Seguiu-se as metodologias descritas por Tharmaraj e Shah (2003) e Ashraf e Shah (2011).

Para análise de *Lactobacillus acidophilus* foram semeadas em profundidade em placas de Petri estéreis as diluições da amostra (10^{-4} a 10^{-6}). Adicionou-se Ágar MRS-sorbitol fundido e esperou-se a solidificação. Para o preparo utilizou-se 90 mL ágar MRS adicionado de 10 mL de solução estéril de D-sorbitol a 10% (100 g/L de D-

sorbitol; 1 L água destilada). As placas inoculadas foram incubadas em condições anaeróbicas a temperatura de 37 °C por 72 horas, conforme Figura 3. A seguir realizou-se a contagem das colônias (UFC/g). Seguiu-se as metodologias descritas por Dave e Shah (1996) e Ashraf e Shah (2011).

Para enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* foram semeadas em placas de Petri estéreis e em profundidade as diluições da amostra (10^{-4} a 10^{-6}). Adicionou-se Ágar MRS-LP fundido e esperou-se a solidificação. Para o preparo desse meio de cultura suplementou-se ágar MRS com 0,05% de L-cisteína (0,5 g/L de L-cisteína para 1 L de meio), 0,3% de cloreto de lítio (3 g/L de cloreto de lítio para 1 L de meio) e 0,9% de propionato de sódio (9 g/L de propionato de sódio para 1 L de meio). As placas inoculadas foram incubadas em condições anaeróbicas a temperatura de 37 °C por 48 horas, conforme Figura 3. Realizou-se a leitura e a contagem das colônias (UFC/g). Seguiu-se as metodologias descritas por Lapierre, Undeland e Cox (1992), Kailasapathy (2006) e Castele *et al.* (2006).

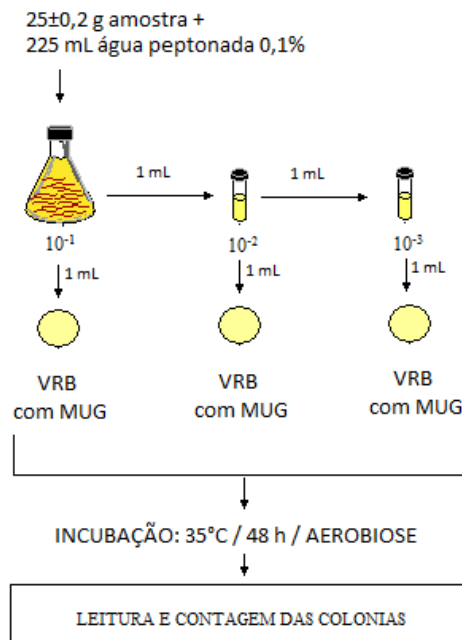


Fonte: Autoria própria (2023)

4.4.1.3 Enumeração de *Escherichia coli*

Para o controle negativo seguiu-se a metodologia descrita na *Food And Drug Administration* - FDA (1998) onde foram semeadas em placas de Petri estéreis e em profundidade as diluições da amostra (10^{-1} a 10^{-3}). Adicionou-se Ágar Violet Red Bile (VRB) com Mug fundido e esperou-se a solidificação, conforme Figura 4. Realizou-se a incubação das placas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48h e realizou-se a contagem das colônias sob luz negra (UFC/g).

Figura 4 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de *Escherichia coli*



Fonte: Autoria própria (2023)

Para enumeração de *E. coli* no controle positivo utilizou-se o teste rápido Cap-Lab Compact Dry EC®, inoculando-se as diluições 10^{-1} a 10^{-3} com incubação das placas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h e posterior realização da contagem das colônias (UFC/g), conforme instruções do fabricante.

4.4.1.4 Enumeração de *Salmonella* sp.

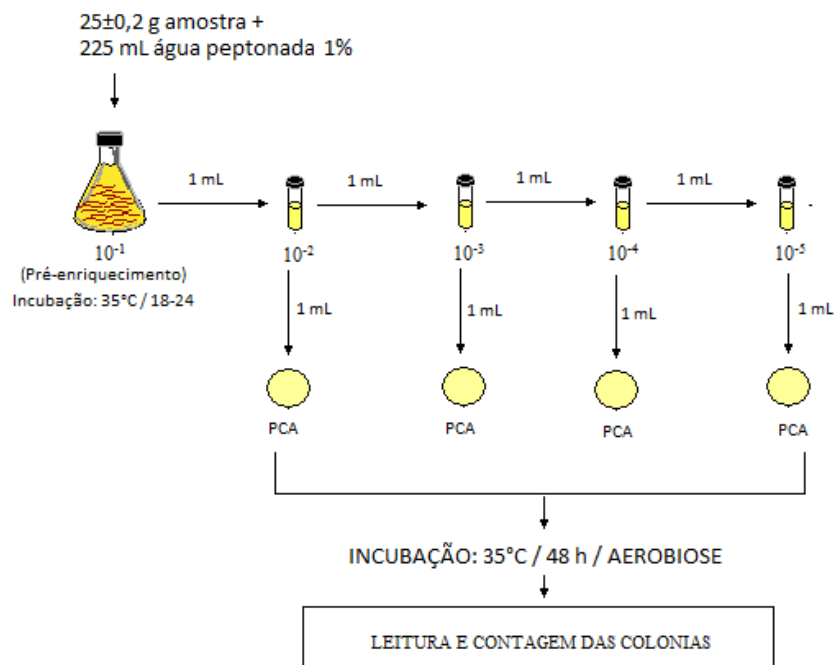
Para o controle negativo seguiu-se a metodologia de análise descrita na ISO 11133 (2014), onde primeiramente preparou-se o caldo de pré-enriquecimento água peptonada 1% (10 g/L). Após pesou-se 25 g da amostra que foi adicionada à 225 mL

do caldo de pré-enriquecimento. Seguiu-se a incubação do caldo mais amostra a 35 °C por 18 - 24 horas. Passado esse período realizou-se a diluição (10^{-1} a 10^{-5}) utilizando-se o caldo incubado.

Transferiu-se 1 mL (inoculação em profundidade) das diluições 10^{-1} a 10^{-5} para placas de Petri estéreis. Adicionou-se 0,4 mL de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC - 0,05 g/L TCC; 1 L água destilada) e o meio de cultura *Plat Count Agar* (PCA) fundido.

Esperou-se a solidificação e realizou-se a incubação a temperatura de 35 °C por 48 horas, conforme Figura 5. Realizou-se a contagem das colônias (UFC/g).

Figura 5 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de *Salmonella* sp



Fonte: Autoria própria (2023)

Para enumeração de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium no controle positivo utilizou-se o teste rápido Cap-Lab Compact Dry SL®, conforme instruções do fabricante. Inicialmente realizou-se o pré-enriquecimento com 25g de amostra em 225mL de água peptonada tamponada a 1%. A incubação nessa etapa foi feita a 36 ± 1 °C por 22 ± 2 horas. Após esse tempo realizou-se o enriquecimento seletivo, onde inoculou-se 0,1mL do pré- enriquecimento em 10mL do caldo Rappaport e Vassiliadis, cuja incubação ocorreu a $41 \pm 0,5$ °C por 22 ± 2 horas. Realizou-se então as diluições até 10^{-5} . Foram plaqueadas as diluições 10^{-1} a 10^{-5} com incubação das placas a $41 \pm$

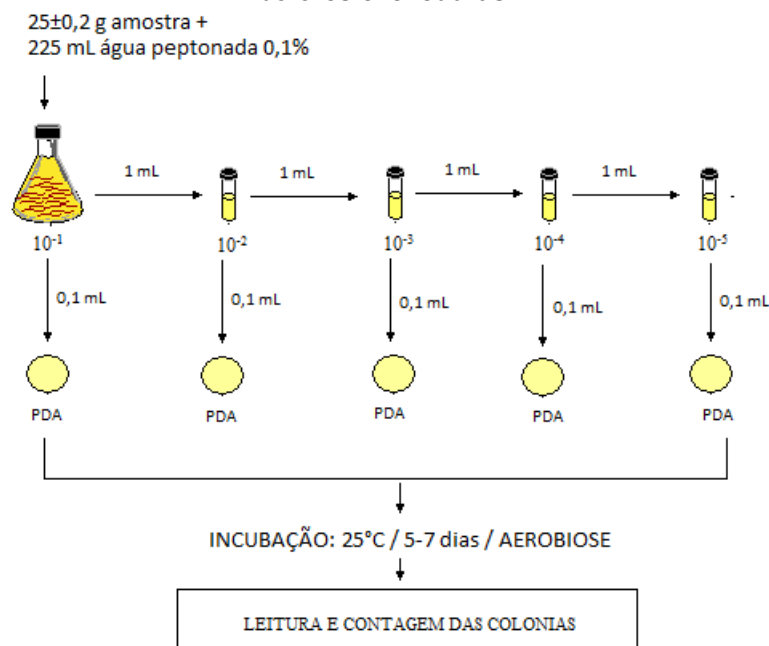
0,5 °C por 22 ± 2 horas com posterior realização da contagem das colônias (UFC/g).

4.4.1.5 Enumeração de bolores e leveduras

Realizou-se a semeadura em superfície (0,1 mL) das diluições da amostra (10^{-1} a 10^{-5}) em Ágar Batata Dextrose BDA (Potato Dextrose Agar – PDA) acidificado (ácido tartárico 10% - 100g/L ácido tartárico; 1L água destilada) e solidificado, conforme Figura 6. Incubou-se as placas a 25 °C por 5 a 7 dias e realizou-se a contagem (separada de bolores e leveduras). Visualizou-se as características microscópicas das colônias de levedura (5 colônias para confirmação), após o preparo de lâminas. Realizou-se o somatório da contagem de bolores e leveduras sendo os resultados expressos em UFC/g (número de UFC x inverso da diluição x 10).

Para essa análise seguiu-se a metodologia descrita por Da Silva *et al.* (2017).

Figura 6 - Esquema da análise microbiológica de enumeração de bolores e leveduras



Fonte: Autoria própria (2023)

4.5 Análises de composição química, propriedades físico-químicas e perfil de textura e viscosidade.

Foram realizadas, em triplicata análises de composição química, propriedades físico-químicas e perfil de textura e viscosidade.

Dentre as análises de composição química estão gordura, proteína total, umidade, extrato seco total e teor de extrato seco desengordurado.

Para análise de gordura utilizou-se o método de Gerber por meio do butirômetro de Gerber (IAL, 2008; BRASIL, 2018).

Na análise de proteína total, determinou-se o nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl, sendo que a determinação da proteína total foi calculada multiplicando-se a percentagem de nitrogênio total pelo fator de correção igual a 6,38 (AOAC, 1995).

A umidade e o extrato seco total (EST) foram determinados por secagem em estufa a 105 °C até peso constante (IAL, 2008; BRASIL, 2018).

O teor de extrato seco desengordurado foi obtido pela diferença matemática, subtraindo-se o teor de gordura do EST obtido quimicamente (IAL, 2008; BRASIL, 2018).

Dentre as análises de propriedades físico-químicas estão pH, acidez, cor e sinérese.

O pH foi medido por meio de potenciômetro Gehaka® PG2000 previamente calibrado antes das determinações, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras (IAL, 2008; BRASIL, 2018).

A acidez foi determinada através da titulação com hidróxido de sódio (NaOH 0,01N) em presença do indicador fenolftaleína (IAL, 2008; BRASIL, 2018).

A cor das amostras (a 8 °C) foi determinada em equipamento colorímetro Minolta® CR 310, por meio dos parâmetros de luminosidade (*L*) e as coordenadas de cromaticidade (**a* e **b*). As condições de operação foram iluminante C e ângulo de 10°, considerando a média de 5 valores por replicação (ARYANA *et al.*, 2007).

Para determinação da sinérese 200 g das amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min e a massa do sobrenadante foi coletada, pesada e usada para o cálculo (% sinérese = massa do soro (sobrenadante) após a filtração / massa da amostra x 100) (FARNSWORTH *et al.*, 2006).

Dentre os parâmetros avaliados no perfil de textura estão firmeza, elasticidade, coesividade e gomosidade. Essa análise foi conduzida nas amostras (100 g) a 8 °C, com o auxílio de texturômetro universal (Stable Micro Systems® TAXT Plus) com probe cilíndrico de fundo chato de 45 mm de diâmetro, força de penetração de 5 g e velocidade de compressão de 3 mm/s. Para obtenção dos dados utilizou-se o *software*

Texture Expert Exceed versão 1.21 para *Texture Profile Analysis* (TPA) (RAWSON; MARSHALL, 1997).

A viscosidade das amostras (100 g a 8 °C) foi determinada por reômetro DV-III Brookfield®, usando sonda cilíndrica nº 3, e velocidade (inicial e final) de 50 rpm, sendo os resultados expressos em centipoise (cP) (SILVA; ABREU; ASSUMPÇÃO, 2012).

4.6 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada após a avaliação e parecer favorável do projeto, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Campus Medianeira da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, conforme registro CAEE nº 68055023.5.0000.0165.

Inicialmente foram realizadas as análises microbiológicas preconizadas pela Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022 (BRASIL, 2022), que estabelece para leites fermentados, limites de crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras. Somente após a determinação da qualidade microbiana, teve início a análise sensorial.

Os candidatos foram convidados a participar de acordo com as datas e horários de realização da análise sensorial por convite de forma presencial nas dependências do campus, bem como por fixação de cartazes nos murais informativos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira. Cento e vinte avaliadores não treinados, com faixa etária acima de 18 anos, foram selecionados na Universidade, entre alunos, professores e funcionários, com base no interesse e disponibilidade em participar da análise.

Antes da avaliação, os participantes foram informados que provariam amostras de iogurte com café. Os avaliadores que concordaram em participar dos testes de aceitabilidade assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), presente no Apêndice A, com as informações do produto e a liberdade de negarem ou desistirem de participar da avaliação a qualquer momento.

Após, responderam a um questionário (APÊNDICE C) sobre dados sócio-demográficos e hábitos de consumo do produto, com tempo de preenchimento estimado em 5 min. Não puderam participar da análise sensorial pessoas alérgicas ou intolerantes a qualquer matéria-prima ou ingredientes usados para a elaboração dos

produtos e portadores de doenças que restringem o consumo de alimentos, como gastrites e problemas renais ou cardíacos, ou outras enfermidades.

As formulações de iogurte avaliadas quanto a aceitação sensorial foram as do controle negativo (ensaios P, PEC, PlaBal e PLaBalEC). Os testes foram conduzidos em cabines individuais do laboratório de Análise Sensorial da UTFPR do Campus Medianeira, equipadas com lâmpadas fluorescentes da cor branca, em uma única sessão com duração de, aproximadamente, 10 minutos por provador. As amostras foram padronizadas em cerca de 10 g, codificadas com três dígitos aleatórios e servidas de forma monádica em copos plásticos descartáveis. Junto com cada amostra foi fornecido um copo com água mineral para o provador limpar o palato entre a avaliação das amostras. Também foi fornecida uma ficha (APÊNDICE b) contendo uma escala hedônica de nove pontos: (1) desgostei muitíssimo; (2) desgostei muito; (3) desgostei moderadamente; (4) desgostei ligeiramente; (5) não gostei/nem desgostei; (6) gostei ligeiramente; (7) gostei moderadamente; (8) gostei muito; (9) gostei muitíssimo (CIVILLE; CARR, 1987; MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 1999; DUTCOSKY, 2013). Os atributos avaliados foram aparência, aroma, cor, sabor, textura e a impressão global. Com os dados obtidos foi calculado o índice de aceitabilidade para cada atributo sensorial, de acordo com a Equação 1, tomando-se como base, a média das notas atribuídas (SANTANA *et al.*, 2006; GULARTE; 2009).

$$\text{Índice de aceitabilidade (\%)} = M/N \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

M = média do somatório dos resultados dos provadores;

N = número de pontos utilizados na escala de avaliação.

4.7 Análise estatística dos dados

4.7.1 Composição química, propriedades físico-químicas, perfil de textura e viscosidade e crescimento microbiano

Na realização da análise estatística os dados de determinação da composição química, propriedades físico-químicas, perfil de textura e viscosidade e crescimento

microbiano foram avaliados quanto a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e quanto a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene.

Para os dados das análises de determinação da composição química, propriedades físico-químicas e perfil de textura e viscosidade (8 triplicatas) foi utilizado o teste ANOVA para 3 fatores seguido do método de Tukey a um nível de significância de 5%. Essa análise considera um delineamento fatorial que mede a interação entre 3 tratamentos: extrato de café canéfora (EC), *Lactobacillus acidophilus* (La) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bal). Nos casos em que pelo menos um dos pressupostos estatísticos para a realização de ANOVA foi ferido, os dados foram avaliados utilizando um modelo linear generalizado (GLM), utilizando a distribuição de densidade de probabilidade *gamma*.

Para os dados de crescimento bacteriano (log UFC/g de 16 triplicatas) foi utilizado o teste ANOVA para 4 fatores (SINGMANN *et al.*, 2023) seguido do método de Tukey a um nível de significância de 5%. Essa análise considera um delineamento fatorial que mede a interação entre 4 fatores fixos: extrato de café canéfora (EC), *Lactobacillus acidophilus* (La), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bal) e Controle (positivo ou negativo). Considerou-se como fator aleatório o tempo, uma vez que foram realizadas medidas de crescimento bacteriano ao longo de 7 tempos (T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7). Nos casos em que pelo menos um dos pressupostos estatísticos para a realização de ANOVA foi ferido, os dados foram avaliados utilizando um modelo de regressão linear mista (BATES *et al.*, 2015). Para esta análise a significância das variáveis preditoras foi avaliada com a distribuição de probabilidade t de *Student*.

4.7.2 Análise sensorial

Para os dados da análise sensorial foram realizadas diversas análises estatísticas. Para as informações obtidas por meio do questionário sócio-demográfico e valores do cálculo do índice de aceitabilidade foi realizada uma análise descritiva. Foram construídos gráficos de barras com frequências relativas em percentagem para as respostas dos 120 provadores para o questionário e, gráficos de barras para índices de aceitabilidade de cada atributo sensorial.

Os dados da escala hedônica foram avaliados quanto a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e quanto a homogeneidade das variâncias pelo

teste de Levene. Posteriormente foi utilizado o teste ANOVA Fator Duplo seguido do método de Tukey a um nível de significância de 5%. Essa análise considera um delineamento fatorial que mede a interação entre 2 tratamentos: extrato de café canéfora (EC) e probióticos (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*). Nos casos em que pelo menos um dos pressupostos estatísticos para a realização de ANOVA foi ferido, os dados foram avaliados utilizando um modelo linear generalizado (GLM), utilizando a distribuição de densidade de probabilidade *gamma*.

Na análise de dados da escala hedônica também foi utilizada uma abordagem multivariada para explorar as relações entre as variáveis e identificar padrões nos dados. O primeiro passo foi realizar o teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para verificar se os dados eram adequados para uma Análise de Componentes Principais (ACP). Um critério de ajuste com um valor KMO superior a 0,5 foi estabelecido. Em seguida, a ACP foi conduzida, onde foram calculados os autovalores da variância percentual cumulativa para avaliar a contribuição de cada dimensão na variabilidade total dos dados.

Uma das etapas do cálculo da ACP foi a elaboração da matriz de correlação de Pearson, sendo realizada a partir dela a construção de um correlograma que indicou os valores dos coeficientes de correlação (r), os quais podem variar de -1 a +1, sendo que quanto mais próximo a +1, maior a relação direta entre as duas variáveis utilizadas. No correlograma, cada intersecção indica a associação entre duas variáveis, sendo possível identificar a relação entre todas as variáveis da escala hedônica, independente do grupo que pertence. Os valores dos coeficientes de correlação indicam significância estatística da associação bivaria ($p < 0,05$).

A ACP possibilitou identificar as variáveis mais influentes na definição das dimensões e a ordenação dos dados. Assim, foi criado um gráfico com elipses para visualizar a separação dos grupos de acordo com cada tipo de iogurte: P, PEC, PLaBal e PLaBalEC. Esse gráfico facilitou a identificação de possíveis agrupamentos ou sobreposições entre os grupos e proporcionou uma compreensão da ordenação dos pontos nas duas primeiras dimensões.

A significância das dimensões obtidas na ACP foi avaliada utilizando-se o pacote "ExpDes.pt" (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021). Foi aplicado o teste ANOVA Fator Duplo, considerando os fatores fixos extrato de café (EC) e probióticos, seguido do método de Tukey a um nível de significância de 5% para

realizar as comparações múltiplas entre os grupos.

Todas as análises estatísticas desse estudo foram obtidas por meio do *software* R Core Team (TEAM, 2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ação do café sobre culturas iniciadoras, probióticas, deteriorantes e patogênicas

A enumeração dos microrganismos da cultura *starter* pode ser visualizada na Tabela 2. A legislação brasileira estabelece uma contagem mínima de 7 Log UFC/g (BRASIL, 2007) para bactérias lácticas totais em iogurtes. Assim, pode-se dizer que todos os ensaios formulados estiveram de acordo com os requisitos microbiológicos para as contagens desses microrganismos durante o período de armazenamento de sete semanas.

Verificou-se que para *Streptococcus thermophilus* não houve diferença no crescimento bacteriano nos controles negativo e positivo (Figura 7; $t = 0,001$; $p > 0,05$), ou seja, não houve influência dos microrganismos contaminantes (patogênicos) no seu crescimento. Da mesma maneira, não foi identificada influência de extrato de café (EC) (Figura 7; $t = 0,211$; $p > 0,05$), *Lactobacillus acidophilus* (La) (Figura 7; $t = 0,023$; $p > 0,05$) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bal) (Figura 7; $t = -0,001$; $p > 0,05$) sobre essa cultura. O mesmo resultado foi observado para o outro microrganismo da cultura *starter*, ou seja, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Figura 7; controle: $t = 0,036$; $p > 0,05$; EC: $t = 0,198$; $p > 0,05$; La: $t = 0,104$; $p > 0,05$; Bal: $t = 0,008$; $p > 0,05$).

Fonseca *et al.* (2014) e Fernandes *et al.* (2016) destacam que um dos principais parâmetros de qualidade do iogurte consiste na sobrevivência e viabilidade de bactérias da cultura iniciadora durante o período de vida útil desse produto. Assim, ao serem pesquisados novos aditivos e ingredientes deve-se avaliar sua ação perante estes microrganismos (FONSECA *et al.*, 2014).

Tamime (2008) explica que o sabor do iogurte é resultado da produção de compostos aromáticos durante a fermentação, sendo que as bactérias da cultura *starter*, especialmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são as principais responsáveis. Porém, o mesmo autor esclarece que altas contagens de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pode resultar em produção contínua de ácido durante o armazenamento, o que leva a um produto com sabor excessivamente ácido.

Tabela 2 - Enumeração dos microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log UFC/g) nos oito ensaios de iogurte

Ensaio	T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7		
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	
<i>S. thermophilus</i>	P	8,06±0,6 1Ca	8,03±0,7 0Ca	8,21±0,62 BCa	8,22±0,62 62BCa	8,35±0,63 ^A BCa	8,40±0,65 65ABCa	8,48±0,70 70ABCa	8,49±0,69 69ABCa	8,57±0,73 ABCa	8,62±0,76 ABCa	8,72±0,88 ABa	8,72±0,83 83ABa	8,80±0,90 0Aa	8,80±0,82 82Aa
	PEC	8,16±0,6 9Ca	8,13±0,6 6Ca	8,24±0,69 BCa	8,27±0,63 63BCa	8,31±0,73 ABCa	8,34±0,64 64ABCa	8,42±0,78 78ABCa	8,43±0,70 70ABCa	8,48±0,78 ABCa	8,53±0,77 ABCa	8,59±0,83 ABa	8,62±0,81 81ABa	8,64±0,83 3Aa	8,69±0,80 80Aa
	PLa	8,13±0,7 0Ca	8,02±0,7 1Ca	8,26±0,66 BCa	8,18±0,68 68BCa	8,46±0,74 ABCa	8,38±0,73 73ABCa	8,59±0,82 82ABCa	8,56±0,81 81ABCa	8,68±0,86 ABCa	8,64±0,85 ABCa	8,81±0,88 ABa	8,76±0,86 86ABa	8,89±0,86 6Aa	8,84±0,89 89Aa
	PLaEC	8,14±0,7 5Ca	8,11±0,7 3Ca	8,22±0,74 BCa	8,22±0,71 71BCa	8,32±0,77 ABCa	8,34±0,75 75ABCa	8,42±0,81 81ABCa	8,44±0,82 82ABCa	8,49±0,80 ^A BCa	8,54±0,79 ABCa	8,59±0,83 ABa	8,62±0,82 82ABa	8,67±0,84 4Aa	8,70±0,83 83Aa
	PBal	8,15±0,6 6Ca	8,09±0,7 2Ca	8,32±0,62 BCa	8,25±0,68 68BCa	8,39±0,65 ABCa	8,38±0,69 69ABCa	8,49±0,70 70ABCa	8,49±0,75 75ABCa	8,60±0,75 ABCa	8,62±0,81 ABCa	8,74±0,84 ABa	8,71±0,83 83ABa	8,81±0,85 5Aa	8,79±0,85 85Aa
	PBalEC	8,16±0,6 7Ca	8,14±0,6 3Ca	8,25±0,72 BCa	8,26±0,66 66BCa	8,36±0,79 ABCa	8,37±0,74 74ABCa	8,43±0,79 79ABCa	8,45±0,79 79ABCa	8,50±0,79 ABCa	8,53±0,79 ABCa	8,61±0,82 ABa	8,64±0,80 80ABa	8,64±0,82 2Aa	8,71±0,85 85Aa
	PLaBal	8,20±0,6 7Ca	8,19±0,7 0Ca	8,38±0,63 BCa	8,32±0,66 66BCa	8,45±0,73 ABCa	8,43±0,71 71ABCa	8,51±0,73 73ABCa	8,49±0,73 73ABCa	8,60±0,79 ABCa	8,51±1,01 ABCa	8,79±0,91 ABa	8,66±0,96 96ABa	8,84±0,91 1Aa	8,79±0,92 92Aa
	PLaBalEC	8,21±0,7 3Ca	8,12±0,7 6Ca	8,25±0,74 BCa	8,24±0,76 76BCa	8,32±0,79 ABCa	8,34±0,82 82ABCa	8,40±0,80 80ABCa	8,41±0,82 82ABCa	8,47±0,75 ABCa	8,50±0,79 ABC	8,56±0,83 ABa	8,59±0,80 80ABa	8,64±0,9 9Aa	8,67±0,76 76Aa
<i>L. bulgaricus</i>	P	8,16±0,6 6Ca	8,15±0,6 4Ca	8,25±0,64 BCa	8,24±0,66 66BCa	8,39±0,71 ABCa	8,36±0,65 65ABCa	8,49±0,72 72ABCa	8,52±0,72 72ABCa	8,61±0,80 ABCa	8,65±0,80 ABCa	8,75±0,87 ABa	8,78±0,89 89ABa	8,82±0,87 7Aa	8,86±0,87 87Aa
	PEC	8,07±0,6 8Ca	8,05±0,8 3Ca	8,19±0,70 BCa	8,18±0,76 76BCa	8,28±0,74 ABCa	8,34±0,76 76ABCa	8,41±0,82 82ABCa	8,44±0,80 80ABCa	8,50±0,80 ABCa	8,54±0,79 ABCa	8,61±0,86 ABa	8,64±0,76 76ABa	8,67±0,86 6Aa	8,74±0,80 80Aa
	PLa	8,15±0,6 4Ca	8,13±0,5 99Ca	8,30±0,62 BCa	8,21±0,61 61BCa	8,45±0,73 ABCa	8,38±0,63 63ABCa	8,56±0,76 76ABCa	8,50±0,70 70ABCa	8,68±0,82 ABCa	8,66±0,78 ABCa	8,77±0,86 ABa	8,72±0,76 76ABa	8,87±0,82 2Aa	8,87±0,78 78Aa
	PLaEC	8,16±0,6 6Ca	8,12±0,6 2Ca	8,22±0,67 BCa	8,19±0,63 63BCa	8,30±0,69 ABCa	8,30±0,66 66ABCa	8,41±0,73 73ABCa	8,41±0,66 66ABCa	8,47±0,74 ABCa	8,52±0,74 ABCa	8,57±0,75 ABa	8,58±0,77 77ABa	8,62±0,75 5Aa	8,69±0,76 76Aa
	PBal	8,13±0,7 0Ca	8,06±0,7 0Ca	8,29±0,66 BCa	8,24±0,68 68BCa	8,39±0,74 ABCa	8,34±0,72 72ABCa	8,53±0,82 82ABCa	8,50±0,79 79ABCa	8,64±0,86 ABCa	8,59±0,81 ^A BCa	8,73 ±0,88ABa	8,71±0,87 87ABa	8,82±0,88 8Aa	8,79±0,87 87Aa
	PBalEC	8,15±0,6 7Ca	8,14±0,6 1Ca	8,23±0,70 BCa	8,25±0,65 65BCa	8,38±0,72 ABCa	8,35±0,67 67ABCa	8,47±0,76 76ABCa	8,45±0,72 72ABCa	8,56±0,79 ABCa	8,54±0,76 ABCa	8,68±0,79 ABa	8,62±0,78 78ABa	8,76±0,75 5Aa	8,74±0,78 78Aa
	PLaBal	8,18±0,6 9Ca	8,16±0,6 7Ca	8,31±0,65 BCa	8,26±0,66 66BCa	8,41±0,70 ABCa	8,36±0,69 69ABCa	8,49±0,71 71ABCa	8,50±0,76 76ABCa	8,60±0,80 ABCa	8,63±0,80 ABCa	8,80±0,91 ABa	8,73±0,82 82ABa	8,84±0,91 1Aa	8,83±0,86 86Aa
	PLaBalEC	8,19±0,7 3Ca	8,14±0,7 5Ca	8,23±0,73 BCa	8,23±0,73 73BCa	8,31±0,78 ABCa	8,34±0,78 78ABCa	8,39±0,79 79ABCa	8,43±0,81 81ABCa	8,48±0,76 ABCa	8,51±0,78 ABCa	8,57±0,81 ABa	8,60±0,80 80ABa	8,62±0,80 0Aa	8,69±0,78 78Aa

^a Os resultados apresentam a média de log UFC/g ± desvio padrão de 3 repetições, em triplicata.

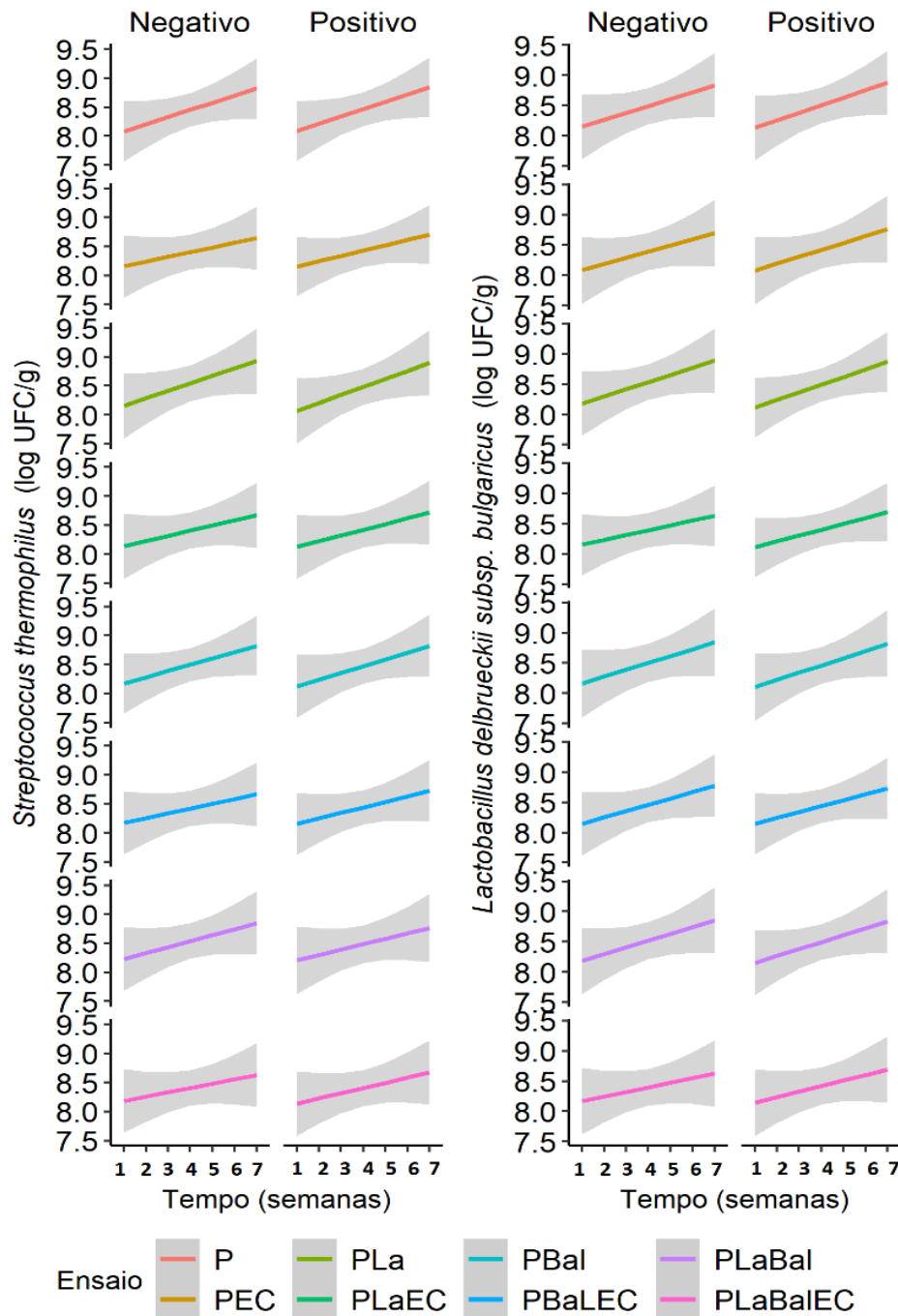
^b Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa entre os tempos para cada ensaio ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

^c Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

^d N: controle negativo; P: controle positivo; T1 a T7: tempo em semanas; P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBalEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 7 - Contagem de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para os grupos controle positivo ou negativo



^a A linha suavizada representa a relação linear dos dados (médias), entre o tempo e a contagem de microrganismos (log UFC/g), e a área sombreada no entorno da linha representa o intervalo de confiança.

^b P: padrão; PEC: Padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBaLEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Tamime (2008) destaca que contagens excessivamente baixas ou altas das duas espécies de bactérias presentes na cultura *starter*, o que não foi detectado no presente estudo, podem levar a defeitos de sabor no iogurte.

Ranadheera *et al.* (2012) verificaram maiores contagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em comparação com *S. thermophilus* em formulações de iogurtes de leite de cabra adicionados de fruta após quatro semanas de armazenamento. Kailasapathy, Harmstorf e Phillips (2008) relataram uma alta viabilidade (> 7 Log UFC/g) de *L. acidophilus* em iogurtes de frutas durante o período de cinco semanas de armazenamento.

Fernandes *et al.* (2016) ao estudarem a vida de prateleira de iogurte sabor café verificaram que o iogurte contendo 0,2% de café solúvel apresentou 7,46 Log UFC/g de bactérias lácticas viáveis no início do armazenamento e 7,30 Log UFC/g após 28 dias de armazenamento. Assim os autores concluíram que a adição de café solúvel no iogurte e o tempo de armazenamento não comprometeram a viabilidade destas bactérias, semelhantemente ao observado no presente estudo.

Os resultados para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* nos ensaios podem ser visualizados na Tabela 3 e, Figuras 8 e 9.

A legislação brasileira não estabelece limites para contagem de *Lactobacillus acidophilus*, porém para o uso de bifidobactérias, a contagem deve ser de no mínimo 6 Log UFC/g ou mL (BRASIL, 2007), sendo que as cepas devem permanecer viáveis até o final da vida útil do iogurte. Portanto, pode-se dizer que os oito ensaios se apresentaram de acordo com o preconizado para as contagens desse microrganismo.

Para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* (Figura 8; $t = -19,149$; $p < 0,0000001$) assim como para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Figura 9; $t = -17,925$; $p < 0,0000001$) não houve diferença significativa entre os controles negativo e positivo, ou seja, a adição dos microrganismos patogênicos não interferiu no crescimento dos probióticos. Além disso, não foi identificada influência significativa da adição de extrato de café na população dos microrganismos probióticos.

Tabela 3 - Enumeração dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (log UFC/g) nos oito ensaios de iogurte

Ensaio	T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7		
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	
<i>L. acidophilus</i>	PLa	6,50±0,4 9 ^{Aa}	6,48±0,0 53 ^{Aa}	6,62±0,0 52 ^{Aa}	6,57±0,0 55 ^{Aa}	6,65±0,5 4 ^{Aa}	6,66±0,0 54 ^{Aa}	6,78±0,0 60 ^{Aa}	6,78±0,0 60 ^{Aa}	6,85±0,63 Aa	6,88±0,0 60 ^{Aa}	6,91±0,6 2 ^{Aa}	6,94±0,0 62 ^{Aa}	6,97±0,0 63 ^{Aa}	7,03±0,0 63 ^{Aa}
	PLaEC	6,52±0,4 9 ^{Aa}	6,53±0,0 50 ^{Aa}	6,61±0,0 54 ^{Aa}	6,64±0,0 54 ^{Aa}	6,73±0,5 8 ^{Aa}	6,77±0,0 61 ^{Aa}	6,81±0,0 64 ^{Aa}	6,84±0,0 66 ^{Aa}	6,87±0,63 Aa	6,91±0,0 65 ^{Aa}	6,94±0,6 7 ^{Aa}	6,98±0,0 69 ^{Aa}	6,99±0,0 69 ^{Aa}	7,09±0,0 66 ^{Aa}
	PLaBal	6,53±0,5 4 ^{Aa}	6,52±0,0 51 ^{Aa}	6,65±0,0 56 ^{Aa}	6,66±0,0 58 ^{Aa}	6,68±0,5 9 ^{Aa}	6,71±0,0 60 ^{Aa}	6,78±0,0 67 ^{Aa}	6,78±0,0 63 ^{Aa}	6,87±0,67 Aa	6,87±0,0 67 ^{Aa}	6,96±0,7 2 ^{Aa}	6,96±0,0 72 ^{Aa}	7,02±0,0 72 ^{Aa}	7,03±0,0 73 ^{Aa}
	PLaBal E aC	6,55±0,5 3 ^{Aa}	6,48±0,0 50 ^{Aa}	6,67±0,0 59 ^{Aa}	6,61±0,0 55 ^{Aa}	6,76±0,6 4 ^{Aa}	6,74±0,0 63 ^{Aa}	6,80±0,0 69 ^{Aa}	6,82±0,0 67 ^{Aa}	6,86±0,69 Aa	6,91±0,0 69 ^{Aa}	6,90±0,6 8 ^{Aa}	6,97±0,0 68 ^{Aa}	6,97±0,0 66 ^{Aa}	7,10±0,0 70 ^{Aa}
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	PBal	6,63±0,6 1 ^{Ca}	6,64±0,0 69 ^{Ca}	6,72±0,0 66 ^{Ca}	6,71±0,0 69 ^{Ca}	6,83±0,6 7 ^{BCa}	6,80±0,0 72 ^{BCa}	6,89±0,0 70 ^{BCa}	6,90±0,0 71 ^{BCa}	7,00±0,75 ABCa	7,01±0,0 75 ^{ABCa}	7,27±0,8 6 ^{ABa}	7,20±0,0 80 ^{ABa}	7,4±0,8 6 ^{Aa}	7,42±0,0 83 ^{Aa}
	PBalEC	6,50±0,5 55 ^{Ca}	6,54±0,0 57 ^{Ca}	6,65±0,0 62 ^{Ca}	6,65±0,0 60 ^{Ca}	6,73±0,6 1 ^{BCa}	6,75±0,0 62 ^{BCa}	6,83±0,0 62 ^{BCa}	6,86±0,0 61 ^{BCa}	7,02±0,71 ABCa	6,95±0,0 64 ^{ABCa}	7,25±0,8 4 ^{ABa}	7,15±0,0 78 ^{ABa}	7,44±0,0 75 ^{Aa}	7,40±0,0 80 ^{Aa}
	PLaBal	6,66±0,5 6 ^{Ca}	6,57±0,0 54 ^{Ca}	6,71±0,0 59 ^{Ca}	6,70±0,0 58 ^{Ca}	6,78±0,6 2 ^{BCa}	6,79±0,0 60 ^{BCa}	6,83±0,0 66 ^{BCa}	6,88±0,0 60 ^{BCa}	6,87±0,65 ABCa	7,02±0,0 64 ^{ABCa}	7,39±0,8 2 ^{ABa}	7,32±0,0 72 ^{ABa}	7,50±0,0 82 ^{Aa}	7,49±0,0 76 ^{Aa}
	PLaBal EC	6,48±0,4 97 ^{Ca}	6,50±0,0 535 ^{Ca}	6,67±0,0 548 ^{Ca}	6,64±0,0 597 ^{Ca}	6,68±0,5 92 ^{BCa}	6,71±0,0 591 ^{BCa}	6,78±0,0 591 ^{BCa}	6,78±0,0 564 ^{BCa}	6,85±0,63 2 ^{ABCa}	6,94±0,0 53 ^{ABCa}	7,33±0,7 8 ^{ABa}	7,29±0,0 75 ^{ABa}	7,55±0,0 70 ^{Aa}	7,46±0,0 80 ^{Aa}

^a Os resultados apresentam a média de log UFC/g ± desvio padrão de 3 repetições, em triplicata.

^b Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa entre os tempos para cada ensaio ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

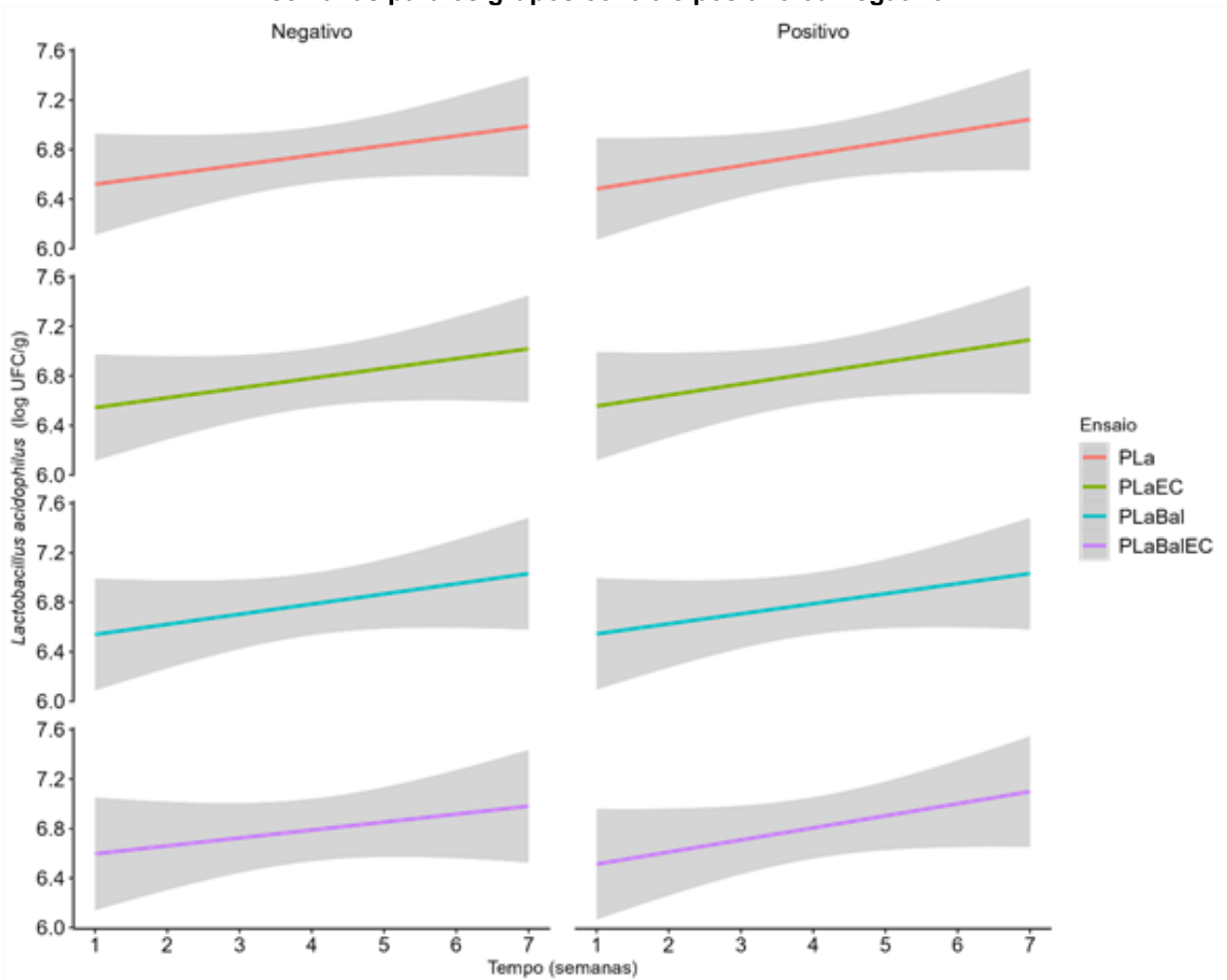
^c Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^d N: controle negativo; P: controle positivo; T1 a T7: tempo em semanas.

^e P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBalEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 8 - Contagem de *Lactobacillus acidophilus* nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para os grupos controle positivo ou negativo

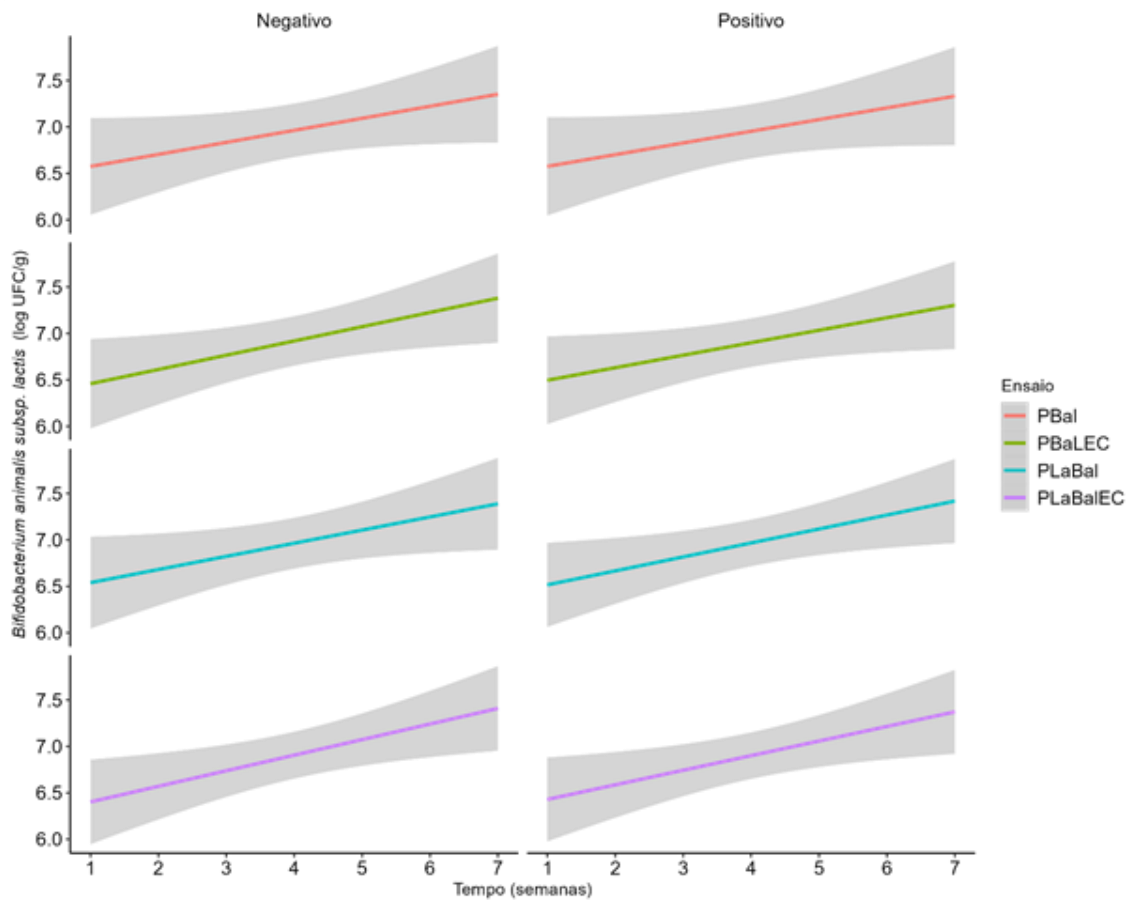


^a A linha suavizada representa a relação linear dos dados (médias), entre o tempo e a contagem de microrganismos (log UFC/g), e a área sombreada no entorno da linha representa o intervalo de confiança.

^b P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBalEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 9 - Contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para os grupos controle positivo ou negativo



^a A linha suavizada representa a relação linear dos dados (médias), entre o tempo e a contagem de microrganismos (log UFC/g), e a área sombreada no entorno da linha representa o intervalo de confiança.

^b P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBaLEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Apesar de Tripathi e Giri (2014) afirmarem que as espécies de *Lactobacillus* sp. são mais adequadas para aplicação em alimentos em comparação a espécies de *Bifidobacterium* sp., nesse estudo não foi observada diferença significativa entre as contagens desses microrganismos durante o período de armazenamento (Tabela 3). Ribeiro *et al.* (2018) e Sharma *et al.* (2023) evidenciam a importância da manutenção da viabilidade das cepas probióticas bem como das características desejáveis dos alimentos fermentados durante o processamento e estocagem, para garantir segurança e os efeitos benéficos desses produtos ao serem consumidos.

Entretanto, para proporcionar os benefícios de saúde, os microrganismos probióticos devem permanecer viáveis no alimento em uma dose eficiente durante toda a

fabricação e a vida útil de um produto, sendo que a recomendação de ingestão diária mínima de probióticos é de 6 - 9 Log UFC/g ou mL, ou pelo menos 8 Log UFC por porção (HILL *et al.*, 2014; PIMENTEL *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2023).

De maneira semelhante a esse estudo, Sales *et al.* (2020) investigaram o efeito *in vitro* de espécies de café, grau de torra e descafeinação sobre bactérias probióticas e *Escherichia coli*. Verificaram que os extratos aquosos de café de torra média das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (0,5 a 1,5% de café solúvel) promoveram o crescimento de todas as bactérias probióticas testadas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Bifidobacterium animalis*), mas não o crescimento de *Escherichia coli*.

Os resultados do crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium nesse estudo podem ser visualizados na Tabela 4 e, Figuras 10 e 11.

Observou-se que nos ensaios em que o microrganismo *Escherichia coli* foi adicionado, houve efeito significativo do fator controle, já que não ocorreu crescimento deste no controle negativo e por outro lado observou-se crescimento nos ensaios do controle positivo (Tabela 4; Figura 10; $t = 4,110$; $p = 0,000257$). O mesmo comportamento foi observado para o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (Tabela 4; Figura 11; $t = 4,282$; $p = 0,000158$). Já para bolores e leveduras, não identificou-se crescimento em nenhum dos ensaios dos controles, o que justifica a ausência de comparação estatística dos dados desses microrganismos.

Quando considerada a ação do extrato de café, pode-se verificar que houve influência no crescimento dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium nas semanas 6 e 7, como evidenciado pelo teste de Tukey (Tabela 4; Figuras 10 e 11; $p < 0,05$).

Canci *et al.* (2022) ao investigarem o potencial antimicrobiano de extratos de *C. arabica* e *C. canephora* contra patógenos e *Lactobacillus* sp. em leite em pó reconstituído, verificaram que os extratos de café torrados apresentaram potencial antimicrobiano reduzindo as contagens de *Salmonella* Typhimurium e inibindo completamente o crescimento de *E. coli*. O extrato de *C. canephora* torrado na concentração de 5,0% foi o agente mais promissor, o que foi correlacionado com o teor de melanoidinas, e reduziu a multiplicação dos patógenos, sem afetar o crescimento de cepas probióticas (*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*), semelhantemente a esse estudo.

Tabela 4 - Enumeração dos microrganismos patogênicos (log UFC/g) e pHs inicial (T1) e final (T7) nos oito ensaios do controle positivo de iogurte

Ensaio	T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7	
	log UFC/g	pH	log UFC/g	pH	log UFC/g	pH	log UFC/g	pH	log UFC/g	pH	log UFC/g	pH	log UFC/g	pH
<i>E. coli</i>	P ⁺	1,83±1,58 ^{BCa}	4,62	3,66±0,27 ^{Aa}	3,70±0,29 ^{Aa}	1,88±1,63 ^{ABa}	1,86±1,61 ^{BCa}	1,78±1,55 ^{Ca}	1,77±1,53 ^{Ca}	4,60				
	PEC ⁺	1,88±1,64 ^{BCa}	4,56	3,61±0,35 ^{Aa}	3,59±0,36 ^{Aa}	3,55±0,35 ^{ABa}	1,87±1,62 ^{BCa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
	PLa ⁺	1,89±1,65 ^{BCa}	4,64	3,61±0,35 ^{Aa}	3,63±0,38 ^{Aa}	1,89±1,65 ^{ABa}	1,86±1,61 ^{BCa}	1,85±1,60 ^{Ca}	1,78±1,55 ^{Ca}	4,62				
	PLaEC ⁺	1,88±1,63 ^{BCa}	4,58	3,67±0,32 ^{Aa}	3,57±0,39 ^{Aa}	3,65±0,36 ^{ABa}	1,81±1,57 ^{BCa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
	PBal ⁺	1,87±1,62 ^{BCa}	4,63	3,57±0,39 ^{Aa}	3,62±0,31 ^{Aa}	1,87±1,62 ^{ABa}	1,86±1,61 ^{BCa}	1,88±1,63 ^{Ca}	1,77±1,53 ^{Ca}	4,60				
	PBalEC ⁺	1,85±1,60 ^{BCa}	4,57	3,60±0,32 ^{Aa}	3,54±0,27 ^{Aa}	3,54±0,34 ^{ABa}	1,85±1,60 ^{BCa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
	PLaBal ⁺	1,84±1,59 ^{BCa}	4,62	3,54±0,31 ^{Aa}	3,63±0,36 ^{Aa}	1,81±1,57 ^{ABa}	1,85±1,60 ^{BCa}	1,81±1,57 ^{Ca}	1,84±1,59 ^{Ca}	4,59				
	PLaBalEC ⁺	1,87±1,62 ^{BCa}	4,57	3,59±0,46 ^{Aa}	3,43±0,30 ^{Aa}	3,33±0,46 ^{ABa}	1,84±1,59 ^{BCa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
<i>Salmonella</i> sp.	P ⁺	1,77±1,53 ^{BCa}	4,62	3,46±0,37 ^{Aa}	3,56±0,38 ^{Aa}	1,85±1,60 ^{ABa}	1,78±1,55 ^{BCDa}	1,70±1,48 ^{CDa}	1,63±1,43 ^{Da}	4,60				
	PEC ⁺	1,87±1,62 ^{BCa}	4,56	3,55±0,33 ^{Aa}	3,56±0,35 ^{Aa}	3,50±0,35 ^{ABa}	1,81±1,57 ^{BCDa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
	PLa ⁺	1,86±1,61 ^{BCa}	4,64	3,58±0,30 ^{Aa}	3,60±0,36 ^{Aa}	1,88±1,63 ^{ABa}	1,84±1,59 ^{BCDa}	1,83±1,58 ^{CDa}	1,73±1,50 ^{Da}	4,62				
	PLaEC ⁺	1,89±1,65 ^{BCa}	4,58	3,63±0,31 ^{Aa}	3,58±0,35 ^{Aa}	3,65±0,30 ^{ABa}	1,89±1,65 ^{BCDa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
	PBal ⁺	1,89±1,65 ^{BCa}	4,63	3,63±0,31 ^{Aa}	3,65±0,33 ^{Aa}	1,85±1,60 ^{ABa}	1,83±1,58 ^{BCDa}	1,88±1,64 ^{CDa}	1,77±1,53 ^{Da}	4,60				
	PBalEC ⁺	1,88±1,63 ^{BCa}	4,57	3,67±0,33 ^{Aa}	3,60±0,25 ^{Aa}	3,55±0,25 ^{ABa}	1,83±1,58 ^{BCDa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				
	PLaBal ⁺	1,88±1,63 ^{BCa}	4,62	3,52±0,31 ^{Aa}	3,60±0,37 ^{Aa}	1,77±1,53 ^{ABa}	1,81±1,57 ^{BCDa}	1,78±1,55 ^{CDa}	1,77±1,53 ^{Da}	4,59				
	PLaBalEC ⁺	1,85±1,60 ^{BCa}	4,57	3,54±0,44 ^{Aa}	3,38±0,33 ^{Aa}	3,74±0,22 ^{ABa}	1,80±1,56 ^{BCDa}	< 1 ^{Cc}	< 1 ^{Cc}	4,55				

^a Os resultados apresentam a média de log UFC/g ± desvio padrão de 3 repetições, em triplicata.

^b Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa entre os tempos para cada ensaio ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

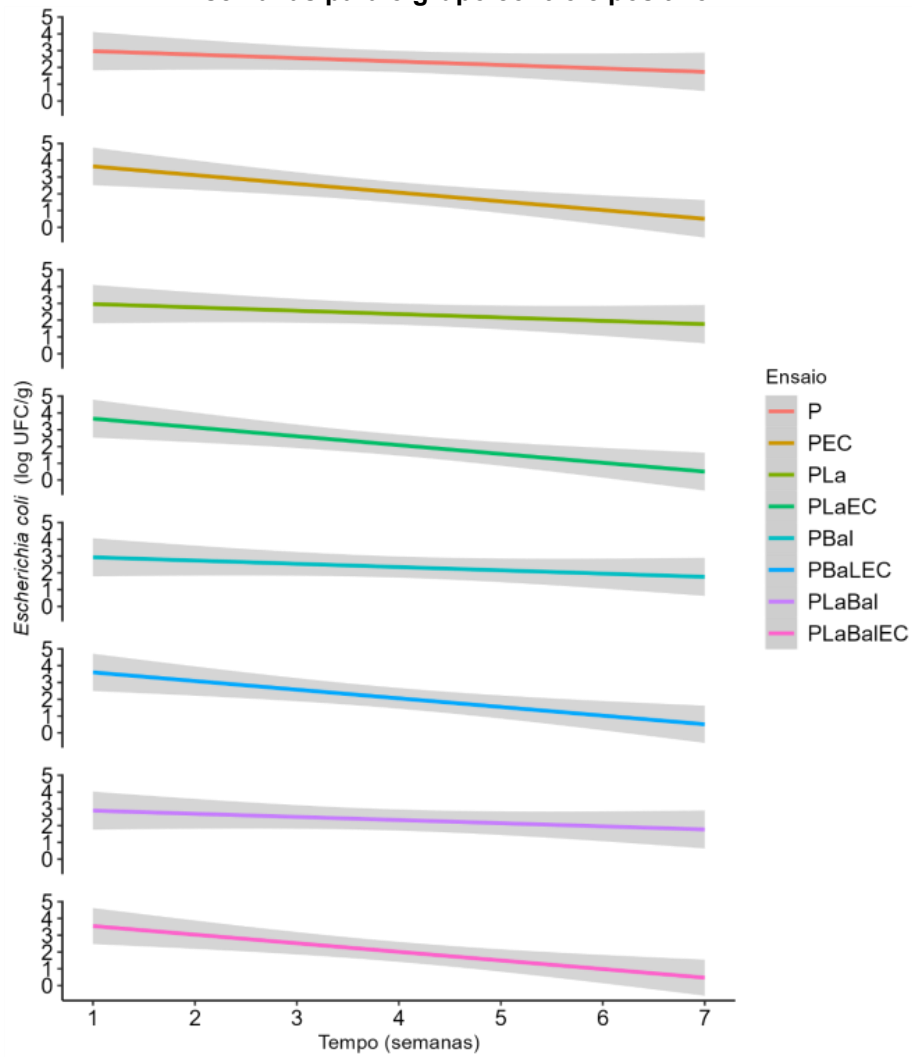
^c Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^d T1 a T7: tempo em semanas.

^e Ensaios do controle positivo: P⁺: padrão; PEC⁺: padrão + extrato de café; PLa⁺: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC⁺: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal⁺: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBalEC⁺: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal⁺: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC⁺: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 10 - Contagem de *Escherichia coli* nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para o grupo controle positivo

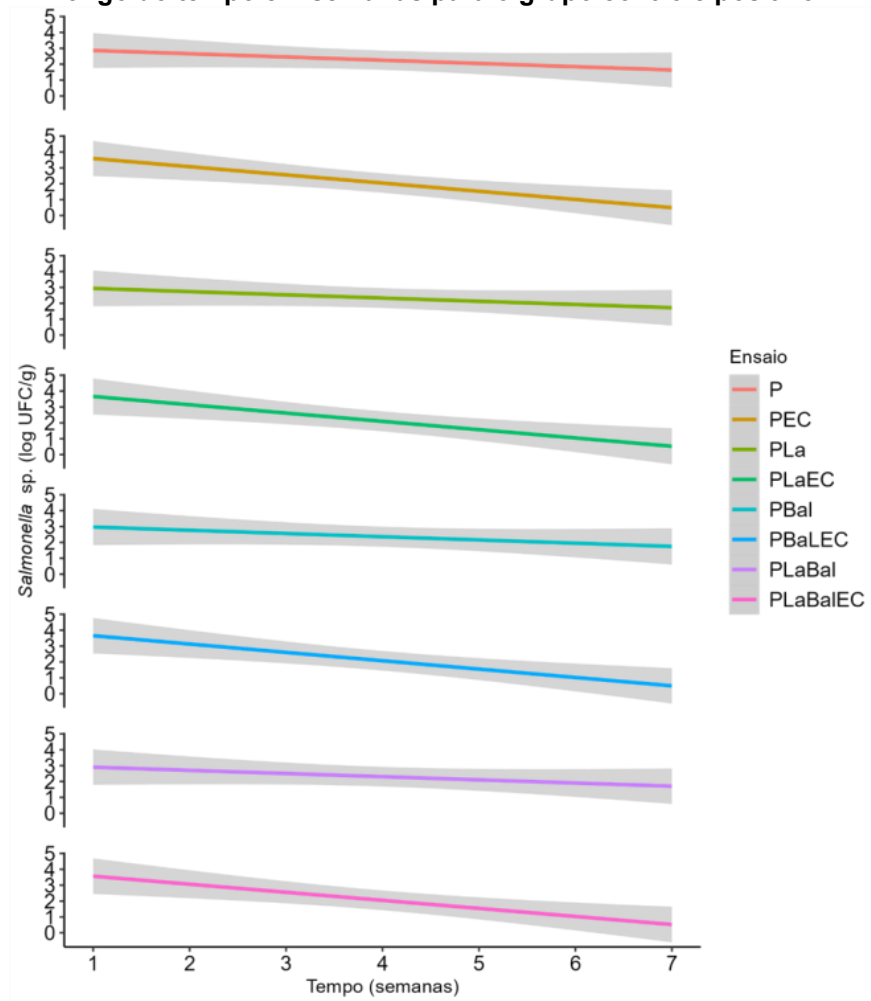


^a A linha suavizada representa a relação linear dos dados (médias), entre o tempo e a contagem de microrganismos (log UFC/g), e a área sombreada no entorno da linha representa o intervalo de confiança.

^b P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBaLEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 11 - Contagem de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium nos diferentes ensaios ao longo do tempo em semanas para o grupo controle positivo



^a A linha suavizada representa a relação linear dos dados (médias), entre o tempo e a contagem de microrganismos (log UFC/g), e a área sombreada no entorno da linha representa o intervalo de confiança.

^b P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLa: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; PLaEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; PBal: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PBaLEC: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

As melanoidinas do café correspondem a um grupo diversificado e complexo de compostos químicos de alto peso molecular, formados como parte dos produtos finais da reação de *Maillard* durante o processo de torra. São em grande parte não digeridas pelo hospedeiro, ou seja, os seres humanos dependem quase exclusivamente da microbiota intestinal para metabolizá-las (HU *et al.*, 2019; PÉREZ-BURILLO *et al.*, 2020). Assim, pode-se dizer que as melanoidinas do café modulam

positivamente a composição da microbiota intestinal (PREEDY, 2015; JIMÉNEZ-ZAMORA; PASTORIZA; RUFÍAN-HENARES, 2015; PÉREZ-BURILLO *et al.*, 2020; CHAN; LIU, 2022), fato este que pode ter ocorrido com o crescimento dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, enquanto foram reduzidas as contagens dos microrganismos patogênicos. De acordo com Bao, Chen e Dai (2019), os polifenóis, incluindo os ácidos clorogênicos, também podem inibir bactérias patogênicas e ajudar a regular os microrganismos intestinais, como é o caso das bifidobactérias.

O efeito antimicrobiano do extrato de café canéfora sobre os microrganismos patogênicos está relacionado à presença dos ácidos clorogênicos, das melanoidinas e da cafeína, sendo que estes também apresentam atividade antioxidante (VIGNOLI *et al.*, 2014; MESIAS; DELGADO-ANDRADE, 2017; LU *et al.*, 2020).

Os ácidos clorogênicos atuam sobre a membrana plasmática presente nas bactérias por meio da formação de poros que aumentam a permeabilidade dessa estrutura, o que promove perda de sua função e rompimento celular com liberação dos componentes citoplasmáticos (CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003; LOU *et al.*, 2011; DUANGJAI *et al.*, 2016). Além disso, também pode afetar a vias de sinalização intracelulares, levando à morte celular (LEE; LEE, 2018; JI *et al.*, 2022) e, induzir o desequilíbrio metabólico intracelular com efeitos bacteriostáticos (JI *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos também podem exercer atividade antimicrobiana através da interrupção da força próton-motriz, do fluxo de elétrons e do transporte ativo (CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003; MARTÍNEZ-TOMÉ *et al.*, 2011).

Li *et al.* (2014) verificaram que os ácidos clorogênicos inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* afetando sua membrana celular, o que foi evidenciado pela visualização em microscópio da estrutura da membrana danificada e da liberação de constituintes celulares, além de mudanças no pH citoplasmático e no potencial de membrana. As descobertas revelaram o potencial dos ácidos clorogênicos como agentes alternativos contra microrganismos patogênicos ou como conservante de alimentos.

A forma de atuação das melanoidinas sobre as bactérias está relacionada às características da parede celular (CANCI *et al.*, 2022). As bactérias Gram-positivas apresentam membrana plasmática, camada espessa de peptidoglicano e ácidos teicóicos (de parede e lipoteicóicos) na constituição de sua estrutura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As Gram-negativas possuem membrana

plasmática (interna), camada delgada de peptideoglicano e membrana externa com lipopolissacarídeos, sendo estas as características que as tornam mais complexas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Como esses microrganismos apresentam diferenças quanto a composição da parede celular, também são diferentes os mecanismos de inibição dos compostos ativos do café entre os dois grupos, mas ainda não estão totalmente elucidados.

As melanoidinas podem exercer atividade antimicrobiana por meio da quelação com íons metálicos por mecanismos diferentes (RUFIAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009). Em baixas concentrações, as melanoidinas podem exercer atividade bacteriostática por quelação com íons do meio de cultura (RUFIAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; MUELLER *et al.*, 2011; MORALES; SOMOZA; FOGLIANO, 2012; PREEDY, 2015). Já em cepas capazes de produzir sideróforos (moléculas de fator de virulência responsáveis pela aquisição de metais) para ingestão de ferro, as melanoidinas reduzem a atividade da bactéria por quelação com o complexo sideróforo-Fe³⁺, o que diminui a virulência desse microrganismo. Essas duas primeiras formas de atuação reduzem a disponibilidade de ferro e interferem no crescimento e processos biossintéticos bacterianos (RUFIAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; MUELLER *et al.*, 2011; MORALES; SOMOZA; FOGLIANO, 2012; PREEDY, 2015).

Mas, além disso, quando em altas concentrações as melanoidinas podem exercer atividade bactericida, por que removem íons magnésio (Mg²⁺) da membrana celular levando à sua desestabilização, o que ocasiona ruptura irreversível dessa estrutura e resulta na liberação de moléculas e morte celular (RUFIAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; MUELLER *et al.*, 2011; MORALES; SOMOZA; FOGLIANO, 2012; PREEDY, 2015; CANCI *et al.*, 2022). Preedy (2015) cita ainda como efeitos antimicrobianos das melanoidinas, a diminuição da captação de glicose e oxigênio além da inibição da atuação das enzimas catabolizadoras de carboidratos nos microrganismos.

Canci *et al.* (2022) ao estudarem o efeito antimicrobiano de extratos de café arábica e café canéfora verdes e torrados, verificaram que as melanoidinas, que são formadas durante o processo de torrefação, foram as responsáveis pela atividade microbiana. Os autores destacaram que apesar de existir a possibilidade de atuação do ácido-5-cafeoilquínico (ácido clorogênico majoritário no café), os extratos de café verdes tiveram efeitos menos pronunciados sobre os microrganismos do que os extratos de café torrados. De maneira semelhante, Monente *et al.* (2015) afirmaram

que o alto teor de melanoidinas do café canéfora promove inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas.

A cafeína induz erros durante a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo, portanto, considerada mutagênica para bactérias (KUHLMANN *et al.*, 1968; BAZZAZ *et al.*, 2019). Diferentes mecanismos foram mencionados para sua atividade antibacteriana. A cafeína apresenta similaridade estrutural com a base nitrogenada adenina, assim, a cafeína acaba sendo incorporada ao DNA ao invés da adenina (LABBE; NOLAN, 1987). Dessa maneira, a cafeína interrompe o emparelhamento de bases no DNA (LABBE; NOLAN, 1987).

Além disso, a cafeína também é considerada um inibidor competitivo na enzima alostérica timidina quinase. A atividade dessa enzima é regulada por adenosina trifosfato (ATP) e a cafeína compete e se liga ao mesmo sítio que o ATP na enzima (SANDLE; KLEPPE, 1980), o que faz com que ocorra sua inibição, ou seja, não ocorrerá a incorporação de adenina e timina ao DNA durante o processo de replicação (KANG *et al.*, 2012; BAZZAZ *et al.*, 2019). Whitney e Weir (2015) ao estudarem os efeitos da cafeína *in vitro* verificaram que houve inibição no crescimento de *E. coli* devido a interação da cafeína com o gene que regula a via de reparo do DNA bacteriano. Kang *et al.* (2012) e Bazzaz *et al.* (2019) salientam ainda que a cafeína aumenta a sensibilidade das células bacterianas a substâncias com atividade antimicrobianas.

Ibrahim *et al.* (2006) realizaram um estudo que mostrou a eficácia da cafeína em inativar e inibir significativamente o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7, indicando que a cafeína tem potencial como agente antimicrobiano para o tratamento da infecção por esse microrganismo e pode ser investigado como um eventual aditivo alimentar para aumentar a segurança de produtos. Outros trabalhos também relataram que a cafeína tem atividades antioxidantes (YASHIN *et al.*, 2013) e antibacterianas contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (NONTHAKAEW *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2022; SURYANTI *et al.*, 2023).

Diante do exposto, pode-se dizer que o efeito do extrato de café sobre o crescimento microbiano indesejado é interessante sob o ponto de vista tecnológico, pois pode aumentar a vida útil dos alimentos de forma complementar ao tratamento térmico (PREEDY, 2015). Entretanto, a atividade antimicrobiana do extrato de café encontrada nesse estudo não é atribuível a apenas um constituinte e nem a um mecanismo específico de ação, já que existem diferentes alvos de atuação na

estrutura celular bacteriana pelos ácidos clorogênicos, melanoidinas e cafeína (ALMEIDA *et al.*, 2006; MARTÍNEZ-TOMÉ *et al.*, 2011). Além disso, os compostos citados podem ter atuado de forma conjunta na inibição dos microrganismos patogênicos. Mas, é importante destacar que Canci *et al.* (2022) não observaram efeito da cafeína na redução dos parâmetros de crescimento no estudo das mesmas cepas patogênicas.

Outro ponto a ser considerado refere-se ao pH mínimo para o desenvolvimento dos microrganismos contaminantes. Melo Franco e Landgraf (2008) estabelecem pH de 4,5 a 5,0 para *Salmonella* sp. e pH 4,3 a 4,4 para *Escherichia coli*. Observou-se crescimento semelhante desses microrganismos nos iogurtes do controle positivo, que apresentaram pHs iniciais entre 4,56 a 4,64 e pHs finais entre 4,55 e 4,62.

Ainda com relação às contagens de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, verificou-se que até T3 nenhum dos tratamentos (EC, La e Bal) afetou o crescimento desses microrganismos. Entretanto, houve redução dos contaminantes nos ensaios sem extrato de café em T4. Alternativamente, poderia ter ocorrido efeito sinérgico entre extrato de café e redução do pH ao longo das semanas de estudo, resultando na manutenção da atividade microbiana dos contaminantes nos ensaios com extrato de café. Mas, ao serem comparados os valores de pH inicial (em T1) e pH final (em T7), não foram identificadas diferenças contrastantes nesse parâmetro. Além disso, na semana quatro não foram identificados efeitos antimicrobianos significativos dos componentes do extrato de café, mas efeito das bactérias ácido lácticas, o que pode ser justificado pela produção de compostos antimicrobianos por essas bactérias, a exemplo das bacteriocinas.

Cabe lembrar que as bacteriocinas podem ser produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e diferem-se quanto ao alvo microbiano, modo de ação, liberação e mecanismos de imunidade (CLEVELAND *et al.*, 2001; SAVADOGO *et al.*, 2006; GILLOR *et al.*, 2008). Tratam-se de proteínas ou peptídeos com atividade antibacteriana que são produzidas nos ribossomos durante o crescimento microbiano (na fase log) (SAVADOGO *et al.*, 2006; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Os microrganismos sensíveis possuem em sua superfície sítios receptores que são bioquimicamente reconhecidos pela bacteriocina, que então penetra na célula promovendo alterações na permeabilidade do sistema de membranas ocasionando a formação de poros (CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER *et al.*, 2005; COTTER; ROSS;

HILL, 2013). A formação de poros acarreta a despolarização da membrana o que faz com que a célula perca sua capacidade de manter sua força próton motriz (mecanismo de entrada e saída de íons) entrando em colapso (SAVADOGO *et al.*, 2006; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; SIDHU; NEHRA, 2019). O microrganismo deixa de possuir diferença de potencial entre os meios interno e externo, necessários para que ocorra a síntese de energia (ATP) e por consequência transporte ativo, movimento celular e demais funções, o que culmina com a sua morte (SAVADOGO *et al.*, 2006; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; SIDHU; NEHRA, 2019).

Por fim, observa-se que a partir da semana cinco ocorreu redução nas contagens dos contaminantes nos ensaios com extrato de café, sendo que em T6 e T7 verificou-se que a presença de extrato de café teve efeito sobre *E. coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em PEC, PLaEC, PBaIEC e PLaBaIEC.

5.2 Análise da composição química dos iogurtes

A composição química do iogurte interfere diretamente na sua qualidade final, pois influencia no seu valor nutritivo, sensorial e vida útil (TAMIME, 2008). Os resultados da composição química dos ensaios de iogurte encontram-se na Tabela 5.

A legislação brasileira estabelece uma classificação quanto ao teor de matéria-gorda láctea (g/100 g) em leites fermentados: com creme (mín. 6,0 g/100 g), integral (3,0 a 5,9 g/100 g), parcialmente desnatado (0,6 a 2,9 g/100 g) e desnatado (máx. 0,5 g/100 g) (BRASIL, 2007). Avaliando-se os resultados expressos na Tabela 5, pode-se dizer que os ensaios elaborados são classificados como iogurte integral.

Os valores de lipídios obtidos nas formulações apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados para os parâmetros de composição química dos oito ensaios de iogurte

Ensaio	Gordura (%)	Proteína (%)	Umidade (%)	EST	ESD
P	3,76±0,10 ^a	4,81±0,07 ^a	62,40±0,61 ^{bc}	20,40±0,41 ^e	16,60±0,36 ^c
PEC	3,55±0,08 ^{ab}	4,74±0,07 ^{ab}	60,90±0,25 ^d	21,40±0,28 ^{bcd}	17,90±0,36 ^b
PLa	3,61±0,13 ^{ab}	4,68±0,03 ^{ab}	63,20±0,69 ^{ab}	22,40±0,31 ^a	18,80±0,18 ^a
PLaEC	3,72±0,06 ^a	4,47±0,13 ^c	61,80±0,78 ^{cd}	21,90±0,13 ^{abc}	18,20±0,19 ^{ab}
PBal	3,58±0,32 ^{ab}	4,83±0,06 ^a	63,90±0,16 ^a	21,70±0,26 ^{abcd}	18,10±0,18 ^{ab}
PBalEC	3,75±0,07 ^a	4,84±0,05 ^a	62,40±0,55 ^{bc}	22,10±0,17 ^{ab}	18,40±0,11 ^{ab}
PLaBal	3,41±0,04 ^{ab}	4,76±0,06 ^{ab}	62,30±0,30 ^{bcd}	21,00±0,29 ^{de}	17,60±0,27 ^b
PLaBalEC	3,32±0,10 ^b	4,58±0,04 ^{bc}	61,20±0,30 ^{cd}	21,20±0,47 ^{cde}	17,80±0,39 ^b

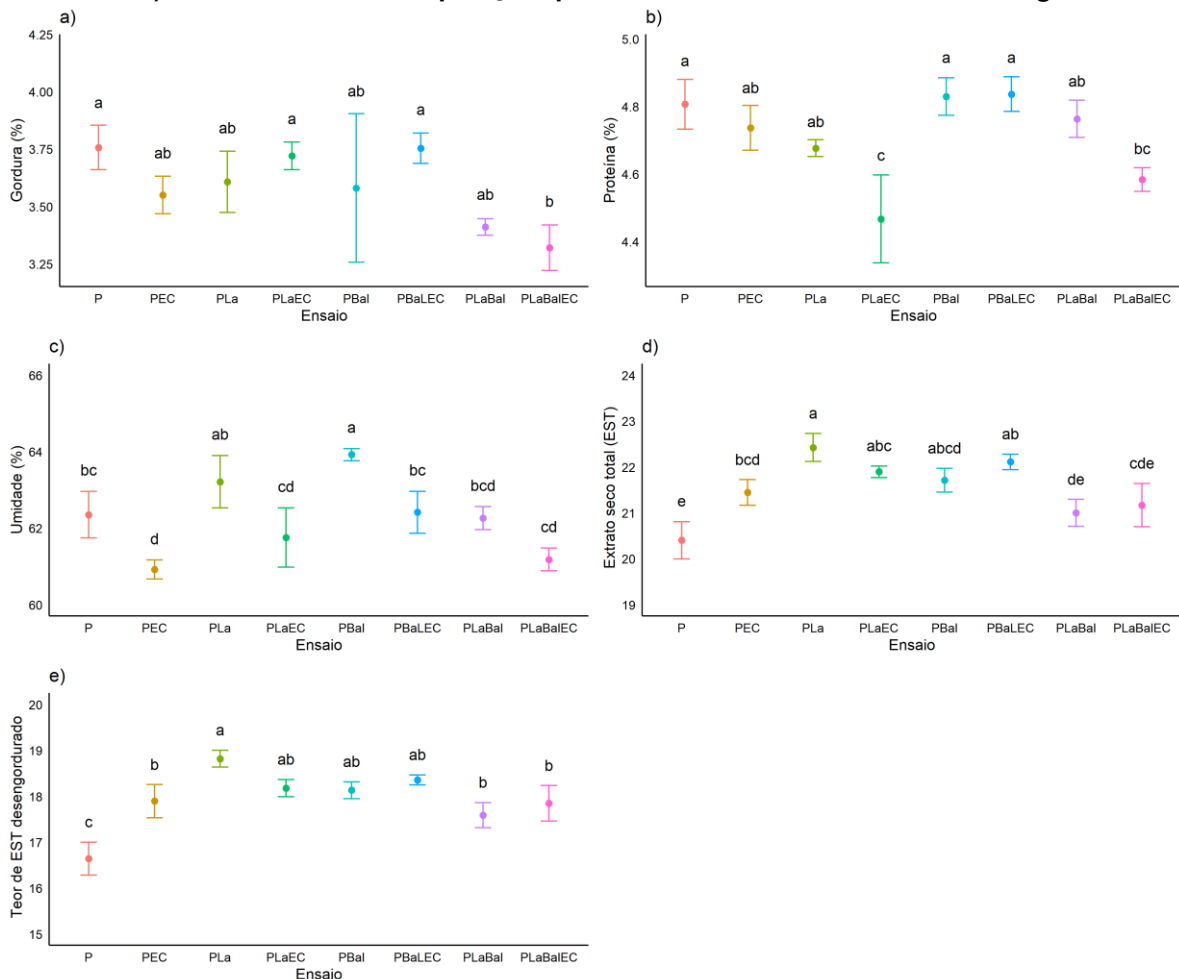
^a Os resultados apresentam a média ± desvio padrão de 3 repetições, em triplicata.

^b Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^c **P**: padrão; **PEC**: Padrão + extrato de café; **PLa**: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; **PLaEC**: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; **PBal**: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; **PBalEC**: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; **PLaBal**: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; **PLaBalEC**: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café. **EST**: extrato seco total. **ESD**: extrato seco desengordurado.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 12 - Representação da média (ponto) e desvios padrão (barras acima e abaixo da média) das variáveis da composição química avaliada em cada ensaio de iogurte



a Letras diferentes acima das barras indicam haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

b *P*: padrão; *PEC*: Padrão + extrato de café; *PLa*: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; *PLaEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; *PBal*: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PBaLEC*: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; *PLaBal*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PLaBalEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

O ensaio PLaBalEC apresentou o menor valor (3,32%) quando comparado aos demais, porém não diferiu estatisticamente dos valores obtidos nos ensaios PEC, PLa, PBal e PLaBal. Verificou-se que a porcentagem de gordura do iogurte foi reduzida quando o La (*Lactobacillus acidophilus*) e Bal (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) foram adicionados isoladamente ou em conjunto (PLa, PBal, PLaBal), e ainda mais reduzida quando o extrato de café (EC) foi adicionado aos dois probióticos juntos (PLaBalEC) (Tabela 5; Figura 12; La: $F = 6,4774$; $p = 0,0216$; Bal: $F = 6,1846$; $p = 0,0243$; La x Bal: $F = 7,3962$; $p = 0,0152$; EC x La x Bal: $F = 6,4774$; $p = 0,0216$).

Tamime (2008) afirma que o nível de gordura no iogurte altera drasticamente

a percepção da sensação satisfatória do produto na boca, ou seja, iogurtes com baixo teor de gordura (abaixo de 0,5 g/100 g) apresentam redução na sua qualidade sensorial, o que é facilmente detectável no palato.

Todavia, no presente trabalho, os valores de gordura variaram de 3,32 a 3,76%. De maneira similar, Olugbuyiro e Oseh (2011) encontraram valores entre 1,88 a 4% ao estudarem iogurtes comercializados na Nigéria. Silva *et al.* (2017) ao determinar o teor de gordura em iogurte probiótico suplementado com extrato de uva, obtiveram valores de 3,10% para a formulação de iogurte sem extrato de uva; 3,80% para formulação com 1,5 g/L de extrato de uva e; 3,40% para a formulação com 3,0 g/L. Em contraste, Magalhães *et al.* (2017) obtiveram valores de 0,55% para a formulação padrão (0% de fitoesteróis) e 1,94% para a formulação com maior concentração de fitoesteróis (3%) em iogurtes de *blueberry*. Verificou-se que todas as formulações sofreram influência pela adição de fitoesteróis por que sua adição foi computada como lipídeo na análise, o que expressou coerência para o produto desenvolvido. Cardoso *et al.* (2022) também encontraram valores mais baixos, entre 2,36 a 2,86% para gordura em iogurtes.

Em relação a proteína, a legislação brasileira estabelece um valor mínimo de 2,9 g/100 g para a fabricação de leites fermentados (BRASIL, 2007). Considerando-se os resultados disponibilizados na Tabela 5, pode-se dizer que os oito ensaios de iogurte elaborados apresentaram-se em conformidade com a regulamentação estabelecida.

Observou-se diferença significativa entre as formulações para proteína, sendo os maiores valores atribuídos a PBalEC, PBal e P (Tabela 5).

O teor de proteína do iogurte foi afetado pela adição de La, Bal e EC. O La e o EC reduziram a quantidade de proteína em relação ao iogurte padrão (PEC e PLa), e quando os dois tratamentos foram combinados (PLaEC), a quantidade de proteína foi ainda menor. O Bal, por outro lado, aumentou a quantidade de proteína do iogurte (PBal e PBalEC) (Tabela 5; Figura 12; EC: $F = 16,4702$; $p = 0,0009$; La: $F = 41,5459$; $p = 0$; Bal: $F = 8,5521$; $p = 0,0099$; EC x La: $F = 8,5521$; $p = 0,0099$).

De acordo com Tamime (2008), os componentes proteicos (cerca de 4,5 - 5,5 g/100 g) e minerais são essenciais para a formação de um coágulo satisfatório em iogurte e é o nível de proteína que vai reger as propriedades físicas do produto final. De maneira semelhante, os autores Penna, Converti e Oliveira (2006) e Marafon (2010) destacam que a concentração e o tipo de proteína podem afetar a textura e as

características reológicas do iogurte.

Os resultados de proteína desse estudo foram semelhantes aos de Velez-Ruiz, Hernandez-Carranza e Sosa-Morales (2013) que obtiveram valores de 3,34 a 4,38% em iogurte desnatado adicionado de fibras e cálcio. Ao estudarem iogurte adicionado de água de coco, Malarkannan, Pandiyan e Geewarghese (2012) encontraram teores de proteína de 3,18 e 5,98%. Semelhantemente, Magalhães *et al.* (2017) encontraram resultados de proteína que variaram de 4,14 a 4,15% em iogurte de *blueberry* com baixo teor de gordura e enriquecido com fitoesteróis. Silva *et al.* (2017) ao estudarem iogurte probiótico suplementado com extrato de uva obtiveram valores de proteína de 4,25% para a formulação sem extrato de uva; 4,27% para formulação com 1,5 g/L de extrato de uva e; 4,30% para a formulação com 3,0 g/L de extrato de uva. Cardoso *et al.* (2022) ao padronizarem e caracterizarem quatro formulações de iogurte com polpa de morango verificaram teores de proteínas entre 3,06 a 3,63%, identificando como fator de influência a maior concentração de leite em pó associada a menor concentração de açúcar e polpa de morango.

Em relação aos valores obtidos para umidade (Tabela 5), foi verificada diferença estatística entre as amostras ao nível de 5% de probabilidade, com o maior valor para PBal (63,9%) e o menor para PEC (60,9%). A umidade do iogurte foi reduzida quando o extrato de café foi adicionado (PEC, PLaEC, PBalEC e PLaBalEC) (Tabela 5; Figura 12; EC: $F = 44,8831$; $p = 0$), bem como quando os microrganismos probióticos La e Bal foram adicionados em conjunto (PLaBal) (Tabela 5; Figura 12; La x Bal: $F = 31,5265$; $p = 0$).

Diferentemente desse estudo, Santos *et al.* (2020) encontraram valores de 81,83% de umidade para iogurte natural e 83,48% para iogurte com extrato de beterraba com limão. Com relação ao percentual de umidade, Magalhães *et al.* (2017) encontraram valores entre 85,14 a 85,34% em iogurtes de *blueberry*. Silva *et al.* (2017) ao analisarem iogurte probiótico com extrato de uva obtiveram valores para umidade de 81,56% para a formulação sem extrato de uva; 80,60% para formulação com 1,5 g/L de extrato de uva e; 81,76% para a formulação com 3,0 g/L.

Quanto ao conteúdo de EST (Tabela 5), houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os diferentes tratamentos. O extrato seco total (EST) foi maior quando adicionado extrato de café no iogurte, uma vez que as médias dos grupos PEC, PLaEC e PBalEC foram maiores do que a média do iogurte padrão (Tabela 5; Figura 12; EC: $F = 4,613$; $p = 0,0474$). Quando adicionado La ao ensaio que

possui café (PLaEC), as médias de EST aumentaram ligeiramente em relação ao iogurte padrão, com significância estatística pelo teste Anova, porém, foi considerado igual ao grupo padrão pelo teste de acompanhamento de Tukey (EC x La: $F = 12,908$; $p = 0,00244$).

De acordo com Malarkannan, Pandiyan e Geewarghese (2012), o conteúdo de extrato seco total é um importante parâmetro, já que influencia na consistência e na qualidade dos iogurtes. Além disso, Tamime (2008) destaca que a determinação de EST permite monitorar se foi realizada corretamente a padronização do leite bem como a concentração de ingredientes não lácteos, como é o caso do açúcar e o café utilizados na formulação de iogurtes nesse estudo.

Mantovani *et al.* (2012), salientam ainda que o EST é importante para garantir equilíbrio na composição do iogurte e se ultrapassar 25% interfere na água disponível nesse produto, o que pode ocasionar alterações quanto a viscosidade e textura. Tamime e Robinson (2007) ao estudarem os teores de EST em iogurte verificaram que sua consistência foi melhorada por meio do aumento de sólidos totais de 12 para 20 g/100 g.

Contudo, os resultados do presente trabalho foram superiores aos determinados por vários autores. Güler e Park (2011) encontraram valores de 13,16 a 16,72% em iogurtes turcos. Santos *et al.* (2020) obtiveram valores de 13 g/100 g e 19 g/100 g de EST para iogurte natural e iogurte com extrato de beterraba com limão, respectivamente. Magalhães *et al.* (2017) ao analisarem iogurtes de *blueberry* com fitoesteróis verificaram teores médios de EST de 10,67 a 10,83%. Soni *et al.* (2020) ao estudarem iogurte probiótico encontraram valores de 10,34 a 13,11 para EST.

Por outro lado, resultados similares a esse estudo foram observados por Olugbuyiro e Oseh (2011) que obtiveram valores de 20,0 a 21,8% em iogurtes nigerianos. Da mesma maneira, ao determinar EST em iogurte com polpa de morango Cardoso *et al.* (2022) obtiveram valores de 20,01 a 22,68%.

Os teores de extrato seco total desengordurado (ESD) (Tabela 5) determinados em cada um dos ensaios apresentaram diferença estatística entre si. Verificou-se que o teor de ESD do iogurte foi aumentado quando o EC (Tabela 5; Figura 12; EC: $F = 6,0025$; $p = 0,0262$) ou o La (Tabela 5; Figura 12; La: $F = 9,9495$; $p = 0,0061$) foram adicionados isoladamente (PEC e PLa) e quando os dois tratamentos foram combinados (PLaEC) (Tabela 5; Figura 12; EC x La: $F = 17,5413$; $p = 0,0007$). O Bal influenciou as médias dessa variável nos ensaios em que havia La

(PLaBal) e La com EC (PLaBalEC), havendo redução nas médias, mas que ainda ficaram maiores em relação ao iogurte padrão (Tabela 5; Figura 12; La x Bal: $F = 62,0075$; $p = 0$; EC x La x Bal: $F = 18,6892$; $p = 0,0005$).

De acordo com Tamime (2008) o ESD corresponde ao provável teor de proteínas, lactose e minerais do iogurte e, junto a esses componentes é um guia útil de identificação para as possíveis propriedades físicas e nutricionais desse produto.

Assim, alguns autores obtiveram resultados semelhantes para o ESD encontrado nessa pesquisa. Magalhães *et al.* (2017) encontraram ESD com valores que variaram de 9,82 a 11,17% para iogurtes de *blueberry* enriquecidos com fitoesteróis, valores estes menores do que os 12% sugeridos pela Organização Mundial da Saúde para iogurtes com formulação tradicional. Silva (2007) ao desenvolver iogurte simbiótico com culturas tradicionais e probióticas verificou valores de 18,67 a 19,10% para ESD. Lucatto *et al.* (2020) ao estudarem iogurtes probióticos e prebióticos produzidos a partir de leites de vaca e cabra obtiveram valores 18,63 a 19,45% para ESD.

5.3 Análise das propriedades físico-químicas dos iogurtes

Os resultados referentes as propriedades físico-químicas dos iogurtes elaborados no presente estudo estão demonstrados na Tabela 6. Para os valores de pH foi detectada diferença estatística entre as amostras. O ensaio PEC apresentou resultados mais baixos (4,54) quando comparados às demais formulações, porém este valor é estatisticamente semelhante aos dos ensaios PLaEC, PBal, PBalEC e PLaBalEC. Os tratamentos P, PLa e PLaBal, por sua vez, não diferiram significativamente entre si.

Verificou-se que houve efeito do extrato de café na variável pH (Tabela 6; Figura 13; $F = 23,54$; $p < 0,001$). O ensaio PEC apresentou menor pH em comparação aos que não tiveram adição de EC. Não foram encontradas diferenças de pH no iogurte padrão sem café (P), com adição de microrganismos probióticos (PLa, PBal e PLaBal) (Tabela 6; Figura 13; $p > 0,05$) e na combinação de extrato de café e probióticos (PLaEC, PBalEC e PLaBalEC) (Tabela 6; Figura 13; $p > 0,05$).

Tabela 6 - Resultados para os parâmetros de propriedades físico-químicas dos oito ensaios de iogurte

Ensaio	pH	Acidez (% ác. láctico)	Sinérese (%)	Cor		
				L	*a	*b
P	4,61±0,02 ^a	0,75±0,01 ^a	57,00±0,15 ^a	87,90±0,08 ^a	-6,81±0,03 ^d	15,50±0,04 ^d
PEC	4,54±0,05 ^b	0,74±0,01 ^a	57,00±0,12 ^a	49,10±0,10 ^d	9,00±0,12 ^a	24,70±0,28 ^b
PLa	4,62±0,02 ^a	0,63±0,01 ^c	55,80±0,08 ^b	84,30±0,12 ^c	-6,40±0,02 ^{cd}	15,60±0,03 ^d
PLaEC	4,57±0,02 ^{ab}	0,63±0,01 ^c	56,10±0,08 ^b	49,10±0,04 ^d	8,63±0,35 ^{ab}	24,90±0,30 ^b
PBal	4,61±0,02 ^{ab}	0,69±0,01 ^b	55,10±0,20 ^c	88,60±1,31 ^a	-6,63±0,05 ^d	14,60±0,04 ^e
PBalEC	4,59±0,01 ^{ab}	0,69±0,01 ^b	55,90±0,15 ^b	49,20±0,03 ^d	8,36±0,34 ^b	25,00±0,20 ^{ab}
PLaBal	4,61±0,02 ^a	0,68±0,01 ^b	54,30±0,20 ^d	86,00±0,10 ^b	-5,94±0,03 ^c	16,30±0,03 ^c
PLaBalEC	4,56±0,03 ^{ab}	0,68±0,01 ^b	54,10±0,19 ^d	49,20±0,08 ^d	8,43±0,33 ^{ab}	25,50±0,36 ^a

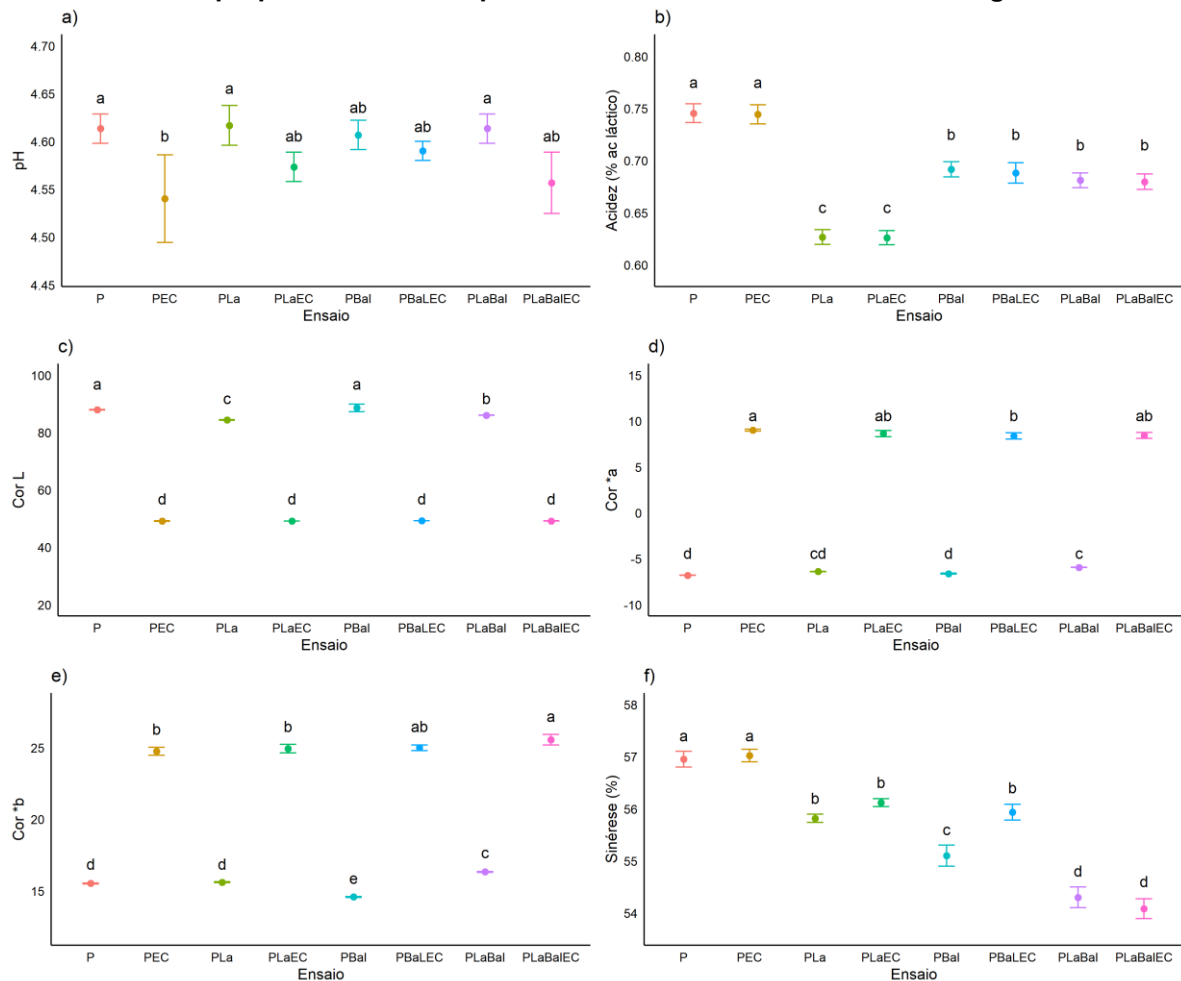
^a Os resultados apresentam a média ± desvio padrão de 3 repetições, em triplicata.

^b Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^c **P**: padrão; **PEC**: Padrão + extrato de café; **PLa**: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; **PLaEC**: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; **PBal**: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; **PBalEC**: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; **PLaBal**: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; **PLaBalEC**: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 13 - Representação da média (ponto) e desvios padrão (barras acima e abaixo da média) das variáveis das propriedades físico-químicas avaliadas em cada ensaio de iogurte



^a Letras diferentes acima das barras indicam haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^b **P:** padrão; **PEC:** Padrão + extrato de café; **PLa:** padrão + *Lactobacillus acidophilus*; **PLaEC:** padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; **PBal:** padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; **PBalEC:** padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; **PLaBal:** padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; **PLaBalEC:** padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Os valores de pH próximos a 4,6 encontrados nos ensaios são importantes uma vez que esse pH corresponde ao ponto isoelétrico da precipitação da caseína, o que permite a maior estabilidade do produto (TAMIME, 2008). Dias *et al.* (2020) salientam que os valores ideais devem estar entre 4,0 e 4,6, pois nesta faixa de pH o produto não é sem sabor e nem excessivamente ácido ou amargo. Além disso, essa característica tende a torná-los mais acessíveis para absorção pela parede intestinal em seres humanos (TAMIME, 2008).

De acordo com Moreira *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2012), os valores de pH

podem afetar a atividade metabólica das bactérias e assim favorecer um grupo de microrganismos em detrimento do outro. Barbosa e Gallina (2017) e Ramos *et al.* (2019) afirmam que a presença de probióticos em leite fermentado pode ocasionar o aumento do pH do produto e que valores abaixo de 4,3 podem afetar a viabilidade de algumas espécies de bactérias probióticas.

Diante desse aspecto, Ranadheera *et al.* (2012) encontraram pH inicial de 4,38 para iogurte natural (padrão), enquanto identificou valores iniciais de 4,27, 4,26 e 4,24 para as formulações de iogurtes com adição de frutas a 5%, 10% e 15% respectivamente. Esses autores identificaram diferença significativa no pH entre o iogurte padrão e as formulações de iogurtes com adição de frutas.

Em relação a acidez, a legislação estabelece valores de 0,6 a 2,0 g de ácido láctico/100g para a fabricação de leites fermentados (BRASIL, 2007), portanto, pode-se dizer que os todos os ensaios de iogurte elaborados estão em conformidade com a regulamentação estabelecida (Tabela 6).

Assim como verificado nos valores de pH, a acidez titulável (Tabela 6) também apresentou resultados distintos ao nível de 5% entre os tratamentos estudados. Os menores valores para acidez foram os referentes aos ensaios PLa e PLaEC, com 0,627 e 0,626% de ácido láctico, respectivamente. Os tratamentos P e PEC, que apresentaram maior nível de acidez (0,745 e 0,744% de ácido láctico, respectivamente), são semelhantes entre si.

Além disso, a acidez do iogurte foi afetada pela presença dos microrganismos probióticos. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bal) provocou sua redução quando adicionado ao iogurte (PBal) (Tabela 6; Figura 13; $t = -8,6127$; $p < 0,0001$), sendo que o mesmo foi observado para a adição de *Lactobacillus acidophilus* sozinho ou juntamente com Bal (PLa e PLaBal) (Tabela 6; Figura 13; Bal x La: $t = 11,9173$; $p < 0,0001$). Já a adição do extrato de café não afetou a acidez ($p > 0,05$).

Segundo Dias *et al.* (2020) e Pombo *et al.* (2021), a acidez em iogurtes lhes confere um sabor peculiar. Porém, esses autores salientam que a baixa acidez pode prejudicar o sabor do iogurte e ocasionar dessoramento desse produto por favorecer a contração do coágulo devido à redução da hidratação das proteínas.

Similarmente ao relatado nesse estudo, Oliveira *et al.* (2011) ao realizarem o acompanhamento do processo fermentativo de iogurte de açaí obtiveram pH 4,59 e acidez 1,0078% de ácido láctico. Costa *et al.* (2012) também obtiveram valores próximos ao estudarem o processo de fermentação de iogurte de juçaí, com valores

de pH 4,71 e acidez titulável de 0,63% de ácido láctico. Magalhães *et al.* (2017) durante a caracterização físico-química de quatro formulações de iogurte de *blueberry* com baixo teor de gordura e enriquecido com fitoesteróis (0%, 1%, 2% e 4%) obtiveram valores entre 0,94 a 0,95% de ácido láctico enquanto o pH foi de 4,67 em todas as formulações.

Turgut e Cakmakci (2018) ao estudarem iogurte probiótico feito com marmelada de morango verificaram diferenças significativas nos valores de pH e acidez titulável, sendo que para os iogurtes probióticos encontraram pH 4,46 e acidez de 0,723% e para as amostras de iogurte controle obtiveram pH 4,15 e valores de 0,918% de acidez. Resultados semelhantes também foram observados por Pombo *et al.* (2021) durante o monitoramento do tempo de fermentação e vida de prateleira de iogurte probiótico sabor *pitaya*. Obtiveram pH inicial 6,45 e pH final 4,65 após 42 dias de armazenamento. Além disso, para acidez inicial os valores foram de 0,21% de ácido láctico e para acidez final de 0,91 % de ácido láctico.

Os resultados de acidez aqui apresentados também condizem com os observados por Oliveira *et al.* (2008) (0,75 a 0,79%), são ligeiramente superiores aos relatados por Mazloomi *et al.* (2011) (0,55 a 0,64%) e são inferiores aos citados por Bakirci e Kavaz (2008) (0,9 a 1,07%) e Bertolino *et al.* (2019). Estes últimos verificaram que após 21 dias de armazenamento houve aumento da acidez (0,99 para 1,20% de ácido láctico) para o iogurte fortificado com 6% de café canéfora, enquanto o iogurte fortificado com 6% de café arábica apresentou menor aumento (1,01 para 1,10%).

Os valores de sinérese (Tabela 6) também apresentaram diferença estatística significativa a 5%, sendo os menores resultados de PLaBal (54,3%) e PLaBalEC (54,1%).

Ao avaliar a sinérese pode-se perceber que houve atuação de EC e dos probióticos promovendo sua redução. Os probióticos La e Bal produziram redução na média de sinérese nos ensaios em que estavam presentes sozinhos (PLa e PBal) e quando associados (PLaBal) (Tabela 6; Figura 13; EC: $F = 15,5073$; $p = 0,0012$; EC x La: $F = 10,7108$; $p = 0,0048$; La: $F = 349,8825$; $p = 0$; Bal: $F = 670,2506$; $p = 0$; La x Bal: $F = 5,9922$; $p = 0,0263$). O ensaio com ambos os probióticos e EC (PLaBalEC) teve valores ainda mais reduzidos (EC x La x Bal: $F = 26,0984$; $p = 0,0001$).

Na sinérese ocorrem rearranjos na rede proteica devido a forças atrativas entre as moléculas de caseína ou micelas, o que pode ocasionar a contração do gel com expulsão de líquido, que ao ser liberado forma uma sobrecamada no produto

(ANTUNES, 2005; MORETI, 2009). Portanto, a sinérese do iogurte é um fenômeno insatisfatório caracterizado pela liberação espontânea de água do gel, o que pode afetar seriamente a qualidade e a aceitação do produto pelo consumidor (SAH *et al.*, 2016; BARBOSA; GALLINA, 2017; POMBO *et al.*, 2021).

Assim, os resultados do presente estudo foram divergentes dos obtidos por Michael, Phebus e Schmidt (2010), que demonstraram aumento da sinérese do iogurte após a incorporação de preparações vegetais. Diferentemente, Ranadheera *et al.* (2012) verificaram que a sinérese foi significativamente menor no iogurte natural (padrão) do que em iogurtes adicionados de frutas (5%, 10% e 15%), independentemente dos níveis de suco de frutas adicionados, o que foi justificado pelo seu maior teor de sólidos totais, proteínas, gorduras e cinzas.

Por sua vez, Dönmez, Mogol e Gökmen (2017), ao investigarem o efeito da adição de café em pó e chá verde em pó sobre o comportamento da sinérese e consistência de iogurtes verificaram que a adição de café (1 ou 2%) diminuiu a taxa de sinérese desse produto. O chá verde teve seu efeito sobre a sinérese dependente da concentração, ou seja, diminuiu a taxa de sinérese quando adicionado a 0,02% e causou aumento quando adicionado a 2%. Os dois compostos estudados são ricos em polifenóis que podem afetar a sinérese e o comportamento reológico de iogurtes, entretanto, apresentam diferenças quanto ao perfil dessa substância, o que justifica os resultados observados. Os autores concluíram que os polifenóis presentes no café e no chá verde podem interagir com as micelas de caseína no iogurte, aumentando assim a consistência e reduzindo a taxa de sinérese em certas concentrações.

Na Tabela 6 são apresentados os valores dos parâmetros de cor: luminosidade L , cromaticidade $*a$ e cromaticidade $*b$. De acordo com Minolta Corporation (1994), as coordenadas de cromaticidade $*a$ e $*b$ indicam as direções das cores, sendo: $*a < 0$ (negativo) em direção ao verde e $*a > 0$ (positivo) em direção ao vermelho; $*b < 0$ (negativo) em direção ao azul e $*b > 0$ (positivo) em direção ao amarelo. Os valores de L (luminosidade) podem variar do preto (zero) ao branco (100).

Neste sentido, os resultados obtidos para a coordenada de cromaticidade $*a$, apontam em todos os tratamentos com adição de extrato de café, valores positivos ($*a > 0$), o que corresponde a direção do vermelho. Por outro lado, as amostras sem adição de extrato de café apresentaram valores negativos ($*a < 0$), em direção ao verde. Verificou-se que a variável $*a$ teve um aumento em todos os ensaios em que o EC estava presente (PEC, PLaEC, PBaEC e PLaBaEC) (Tabela 6; Figura 13; EC: t =

-82,4025; $p < 0,000001$; EC x La: $t = -2,5140$; $p = 0,0230$; EC x Bal: $t = -2,6897$; $p = 0,0161$).

Quanto à coordenada de cromaticidade b^* , todos os tratamentos apresentaram valores positivos ($*b > 0$), em direção a cor amarela, porém, com valores maiores nas amostras com adição de extrato de café. A variável $*b$ teve um aumento quando o EC estava presente sozinho, com La, com Bal ou com ambos os probióticos (PEC, PLaEC, PBalEC e PLaBalEC).

Para a luminosidade (L) também ocorreram diferenças entre as amostras com e sem adição de extrato de café, com valores em torno de 49 e 87, respectivamente. Observou-se que o EC sozinho ou com os probióticos teve efeito de redução da variável L (Tabela 6; Figura 13; $t = 1257,83$; $p < 0,000001$; EC x La: $t = 4,6186$; $p = 0,0003$; EC x Bal: $t = -3,0187$; $p = 0,0081$).

Levando-se em consideração a coloração escura característica do extrato de café e a concentração adicionada (5 g/100 g) em quatro dos ensaios, justifica-se a diferença de cor observada.

Martins (2005) ao desenvolver *smoothies* de frutos tropicais com iogurte de leites de ovelha e vaca obteve valores de L de 51,39 para polpa de goiaba e 43,65 e 70,24 para mamão e banana, respectivamente, sendo que o mamão apresentou valor menor devido a coloração ser mais escura, enquanto, a banana por apresentar coloração clara teve um valor mais próximo de 100 dentre as frutas analisadas. A diferença de valores obtida entre a polpa de mamão e a polpa de banana se assemelha ao observado para as amostras com extrato de café e sem extrato de café, respectivamente.

Para as coordenadas de cromaticidade $*a$ Martins (2005) encontrou valores de 23,34; 16,32 e; 31,15 para polpa de goiaba, mamão e banana, respectivamente. Nas coordenadas de $*b$ encontrou os valores de 25,97; 18,13 e; 37,98 para as polpas. De maneira semelhante, Aquino, Salomão e Azevedo (2016) obtiveram os valores de L 71,02, $*a$ 3,51 e $*b$ 33,44 em estudos realizados em bananas maduras.

Moro *et al.* (2018) ao avaliarem a cor de quatro marcas comerciais de café em pó e diluído (5 g/100 g) obtiveram valores de 11,02 a 11,46 para L ; valores de 2,34 a 2,42 para $*a$ e; -1,37 a -1,67 para $*b$ de café em pó. Para as amostras diluídas os valores foram de 25,27 a 26,65 para L ; valores de 7,03 a 9,58 para $*a$ e; 7,56 a 7,72 para $*b$.

5.4 Perfil de textura e viscosidade dos iogurtes

A Tabela 7 apresenta os valores dos parâmetros de textura (firmeza, elasticidade, coesividade e gomosidade) e viscosidade.

A textura pode ser definida por aspectos sensoriais e funcionais das propriedades estruturais, mecânicas e superficiais dos alimentos, que podem ser detectadas de maneira cinestésica e por meio da visão, audição e tato (SZCZESNIAK, 2002). As características texturais do iogurte são parâmetros importantes para determinar sua aceitação pelo consumidor (JOYNER, 2019).

Assim, com relação à textura do iogurte, foi possível verificar que os valores diferiram estatisticamente ao nível de 5% para o parâmetro firmeza, sendo que a presença de La (*Lactobacillus acidophilus*) nos ensaios pode ter sido responsável pelo seu aumento. Verificou-se que La e La combinado com EC (PLa e PLaEC) tiveram redução em sua firmeza (Tabela 7; Figura 14; EC: $t = 2,3746$; $p = 0,0304$; La: $t = -29,9500$; $p < 0,000001$). Quando os probióticos foram combinados e em presença de EC (PLaBal e PLaBalEC), houve uma redução ainda maior (Tabela 7; Figura 14; La x Bal: $t = 11,6929$; $p < 0,00001$).

A firmeza nos iogurtes corresponde a força necessária para atingir uma certa deformação e é importante por determinar a qualidade e aceitabilidade desse produto (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2017). Está relacionada ao teor de sólidos totais, conteúdo e tipo de caseína presentes na matéria-prima e, maiores teores de lipídios (OLIVEIRA; DAMIN, 2003; SANDOVAL-CASTILLA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2007).

Conforme relatado por Joyner (2019), o aumento do teor de proteína afeta a textura, onde o enriquecimento do leite com leite em pó desnatado pode resultar no desenvolvimento da rede de micelas de caseínas, evidenciados por meio dos valores de firmeza e elasticidade.

Tabela 7 - Resultados para os parâmetros de textura e viscosidade dos oito ensaios de iogurte

Ensaio	Textura				Viscosidade (cP)
	Firmeza (mN)	Elasticidade (mm)	Coesividade	Gomosidade (N)	
P	-15,20±0,09 ^b	0,73±0,05 ^c	0,65±0,03 ^{cd}	-10,30±0,03 ^{cd}	1727±7,00 ^{bc}
PEC	-15,10±0,07 ^b	0,80±0,02 ^{bc}	0,73±0,03 ^{ab}	-10,30±0,01 ^d	1738±7,55 ^{abc}
PLa	-13,60±0,36 ^a	0,94±0,03 ^a	0,64±0,03 ^d	-9,23±0,07 ^a	1735±12,30 ^{abc}
PLaEC	-13,90±0,08 ^a	0,94±0,05 ^a	0,69±0,04 ^{abcd}	-9,24±0,06 ^a	1741±8,89 ^{abc}
PBal	-16,90±0,06 ^c	0,77±0,03 ^{bc}	0,63±0,03 ^d	-10,20±0,04 ^{cd}	1717±10,80 ^c
PBalEC	-16,90±0,04 ^c	0,78±0,03 ^{bc}	0,65±0,02 ^{bcd}	-10,20±0,05 ^c	1733±9,50 ^{abc}
PLaBal	-13,50±0,07 ^a	0,85±0,04 ^{ab}	0,74±0,04 ^a	-9,69±0,03 ^b	1744±7,64 ^{ab}
PLaBalEC	-13,80±0,08 ^a	0,84±0,04 ^b	0,73±0,02 ^{abc}	-9,78±0,03 ^b	1756±8,54 ^{ab}

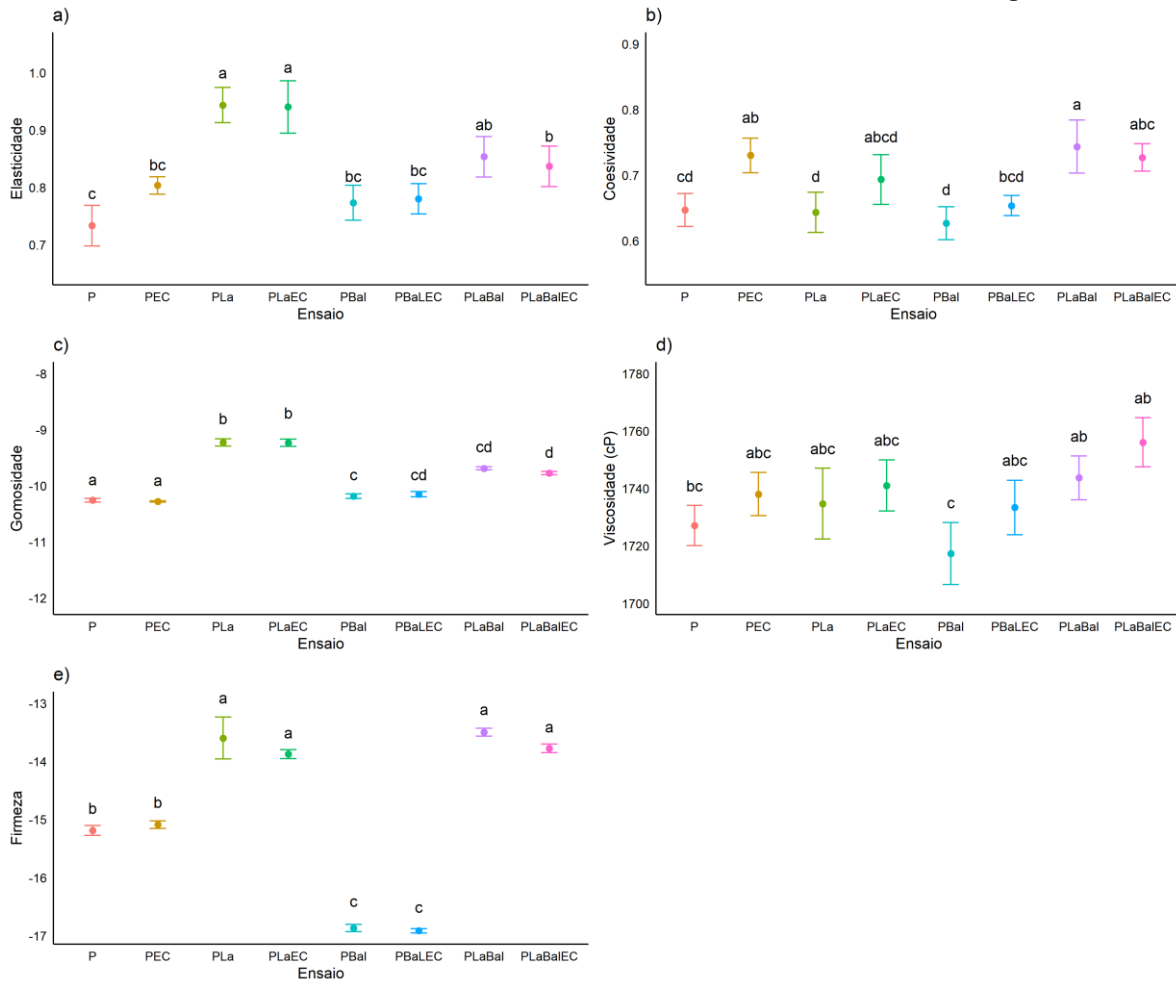
^a Os resultados apresentam a média ± desvio padrão de 3 repetições, em triplicata.

^b Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^c *P*: padrão; *PEC*: Padrão + extrato de café; *PLa*: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; *PLaEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; *PBal*: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PBalEC*: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; *PLaBal*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PLaBalEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 14 - Representação da média (ponto) e desvios padrão (barras acima e abaixo da média) das variáveis de textura e viscosidade avaliadas em cada ensaio de iogurte



a Letras diferentes acima das barras indicam haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

b *P*: padrão; *PEC*: Padrão + extrato de café; *PLa*: padrão + *Lactobacillus acidophilus*; *PLaEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + extrato de café; *PBal*: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PBaLEC*: padrão + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café; *PLaBal*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PLaBaLEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

Em contraste a este estudo, Mudgil, Barak e Khatkar (2017) ao estudarem a análise do perfil de textura de iogurte influenciado por goma guar parcialmente hidrolisada obtiveram valores elevados de firmeza (38,7 a 54,7 mN). Já Lucatto *et al.* (2020) ao avaliarem o desempenho de culturas microbianas em iogurtes probióticos e prebióticos de leites de vaca e cabra, obtiveram valores de firmeza entre 5,61 a 12,85 mN, sendo esse último mais próximo aos valores aqui obtidos.

Para a elasticidade, foi detectada diferença estatística entre as amostras ao nível de 5% de significância, onde verificou-se maiores valores de elasticidade para PLa (0,943 mm) e PLaEC (0,94 mm), ou seja, para a elasticidade, o La aumentou a média da variável (Tabela 7; Figura 14; La: $F = 81,4922$; $p = 0$; Bal: $F = 10,8876$; $p = 0,0045$). Além disso, quando os dois probióticos foram usados juntos em presença ou não de extrato de café (PLaBal e PLaBalEC), houve um aumento em relação ao padrão (P), mas uma diminuição em relação ao La isolado em presença ou não de café (PLa e PLaEC) (Tabela 7; Figura 14; La x Bal: $F = 15,3837$; $p = 0,0012$).

A elasticidade é a taxa na qual uma amostra retorna às suas dimensões normais depois que a força deformante for removida (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2017), sendo que essa propriedade sofre forte influência da matriz proteica (RAWSON; MARSHALL, 1997). Diante desse aspecto, Lucatto *et al.* (2020) obtiveram valores de 0,77 a 0,85 mm para elasticidade na primeira semana de armazenamento de iogurtes probióticos e prebióticos de leites de vaca e cabra. Após seis semanas os valores foram de 0,86 a 0,96 mm, valores próximos a esse estudo.

Na coesividade também verificou-se diferença estatística ao nível de 5% de significância, sendo os maiores valores para PLaBal (0,743) e os menores para PLa (0,643) e PBal (0,627). Para a coesividade, o EC sozinho e na presença de La e Bal (PEC, PLaEC e PBalEC) aumentaram a média da variável (Tabela 7; Figura 14; EC: $F = 9,2915$; $p = 0,0077$; La: $F = 10,1759$; $p = 0,0057$; EC x Bal: $F = 6,8794$; $p = 0,0185$). O mesmo foi observado para o ensaio com a presença dos probióticos combinados (PLaBal) (Tabela 7; Figura 14; La x Bal: $F = 23,9246$; $p = 0,0002$).

De acordo com Szczeniak (1963) a coesividade está relacionada às forças de ligações internas que formam um produto. Assim, Rawson e Marshall (1997) encontraram para coesividade valores entre 0,72 e 0,79 em iogurtes probióticos de leite de vaca. Araújo *et al.* (2012) identificaram valores de 0,71 para coesividade em iogurtes fabricados a partir de leite de vaca. Mantovani *et al.* (2012) ao elaborarem iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais obtiveram para coesividade

valores de 0,60 a 0,83.

Para o parâmetro gomosidade foi detectada diferença estatística ao nível de 5% de significância entre as amostras cujos valores estiveram entre -10,3 a -9,23 N. Para esse parâmetro verificou-se que La teve efeito em seu aumento (PLa, PLaEC, PLaBal e PLaBalEC) (Tabela 7; Figura 14; La: $F = 1713,9651$; $p < 0,001$; Bal: $F = 125,7642$; $p < 0,0001$; La x Bal: $F = 289,293$; $p < 0,0001$).

A gomosidade corresponde à energia requerida para mastigar um produto até o estado de deglutí-lo e por isso pode variar de pessoa para pessoa (SZCESNIAK, 1963; MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2017), por esse motivo, o nível de aceitação da goma no iogurte depende de cada consumidor (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2017). Assim, para o parâmetro gomosidade, Mantovani *et al.* (2012) obtiveram valores de 0,05 a 0,12 N em iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais.

Por fim, foi observada diferença significativa entre os resultados de viscosidade dos ensaios (Tabela 7), sendo que os maiores valores foram obtidos para PLaBalEC (1756 cP) e PLaBal (1744 cP). Verificou-se que o EC e o probiótico La (PEC, PLa, PLaEC) promoveram um aumento nas médias de viscosidade (Tabela 7; Figura 14; EC: $F = 9,2641$; $p = 0,0077$; La: $F = 15,8149$; $p = 0,0011$). Nos ensaios em que havia La e foi adicionado o probiótico Bal (PLaBal) e EC (PLaBalEC) também identificou-se o aumento de viscosidade (Tabela 7; Figura 14; La x Bal: $F = 6,5276$; $p = 0,0212$).

Autores como Haully, Fuchs e Prudencio Ferreira (2005), Walstra, Wouters e Geurts (2006) e Tamime (2008) afirmam que a viscosidade em leites fermentados, como o iogurte, interfere na aceitabilidade dos consumidores, já que relaciona-se a resistência do líquido à força a ele aplicada. Este parâmetro é dependente do tipo de substrato, proporção de caseína, tratamento térmico empregado, cultura láctica, condições de incubação e armazenamento, entre outros (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; TAMIME, 2008).

Silva, Abreu e Assumpção (2012) atribuem o aumento na viscosidade de iogurte à presença de bactérias ácido lácticas, que sintetizam exopolissacarídeos, ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas. De maneira complementar Duboc e Beat (2001) salientam que os exopolissacarídeos melhoram as propriedades reológicas dos produtos fermentados, provocando, entre outros fatores, a redução da sinérese. Além disso, Isanga e Zhang (2009) salientam que níveis mais elevados de gordura

também podem contribuir para uma maior viscosidade dos iogurtes onde o leite homogeneizado é usado na produção, uma vez que a homogeneização facilita a formação de copolímeros entre a caseína e os glóbulos de gordura, fortalecendo assim a rede de gel.

Ertem e Çakmakçi (2018) ao avaliarem a vida de prateleira de iogurte probiótico produzido com *Lactobacillus acidophilus* e Gobdin, obtiveram valores entre 6,84 a 8,88 mL/25 g para viscosidade. Ranadheera *et al.* (2012) encontraram valores de 12257,39 a 13237,17 cP para iogurte de frutas e 23834,92 cP para iogurte padrão de leite de cabra, onde a viscosidade do iogurte padrão foi maior do que a dos iogurtes de frutas.

5.5 Caracterização microbiológica e análise sensorial

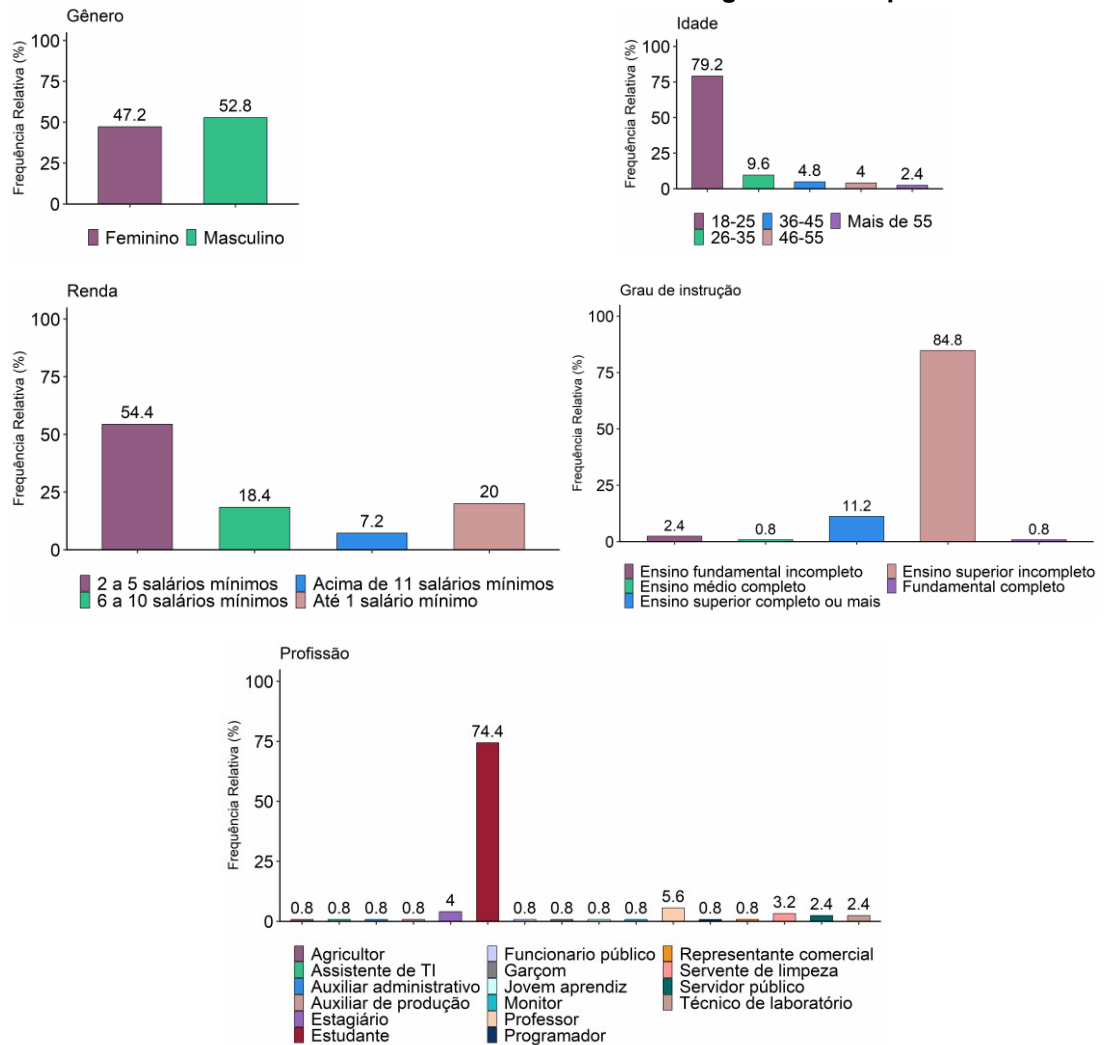
Após a verificação da qualidade microbiológica nos ensaios de iogurte P, PEC, PLaBal e PLaBalEC do controle negativo, onde não houve crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras, foi realizada a análise sensorial das amostras.

5.5.1 Caracterização dos provadores

Os resultados referentes ao levantamento sócio-demográfico dos provadores que participaram da análise sensorial podem ser visualizados na Figura 15.

A análise sensorial realizada foi composta por 47,2% provadores do sexo feminino e 52,8% do sexo masculino. As idades variaram, entretanto, a maioria tinha entre 18 e 25 anos (79,2%). Os demais participantes estiveram divididos nas faixas etárias de 26 a 35 anos (9,6%), 36 a 45 anos (4,8%), 46 a 55 anos (4%) e acima de 55 anos (2,4%).

Em relação à renda, verificou-se que a maioria dos provadores possuía renda de 2 a 5 salários mínimos (54,4%), seguido por aqueles com renda de até um salário mínimo (20%). Cerca de 18,4% tinham uma renda de 6 a 10 salários mínimos, enquanto 7,2% possuíam uma renda acima de 11 salários mínimos.

Figura 15 - Resultados do levantamento de dados sócio-demográficos dos provadores

Fonte: Autoria própria (2023)

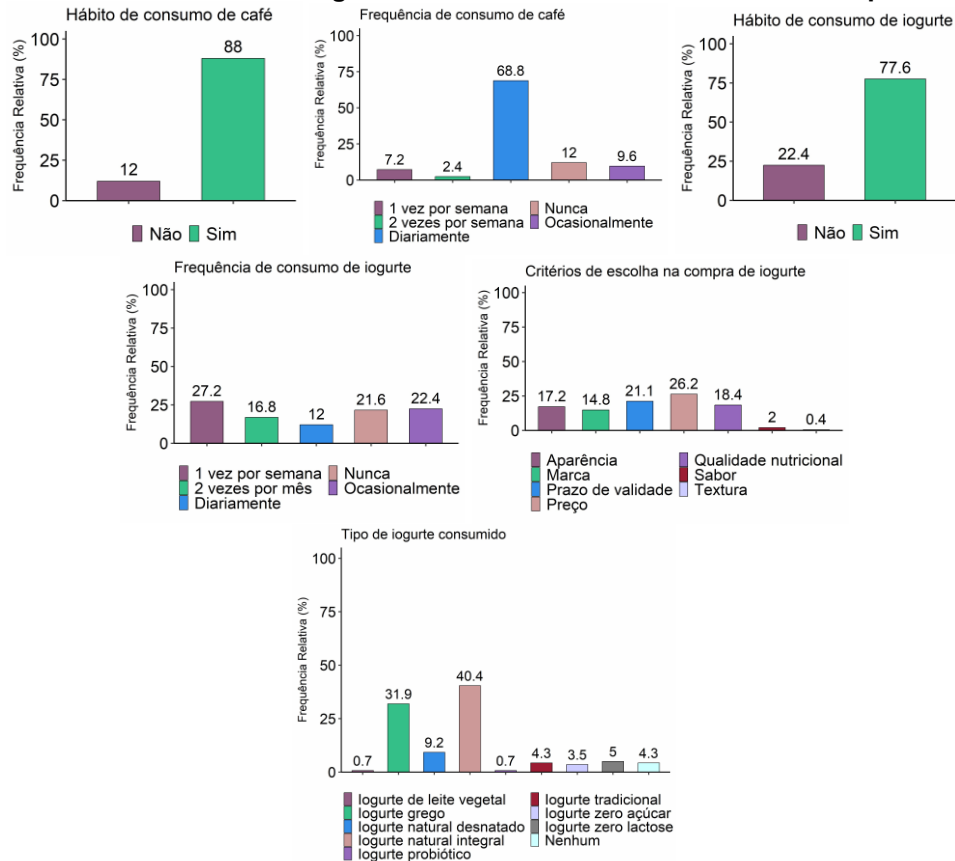
Em termos de educação, observou-se que o grau de instrução predominante foi de alunos com ensino superior incompleto (84,8%). Também se verificou-se que 11,2% tinham ensino superior completo ou mais, 0,8% ensino médio completo, 0,8% ensino fundamental completo e 2,4% ensino fundamental incompleto.

Verificou-se que dentre as profissões dos provadores estavam: estudantes (74,4%), professores (5,6%), estagiários (4%), serventes de limpeza (3,2%) e servidores públicos ou técnicos de laboratório (2,4% cada um). Profissões como agricultor, assistente de tecnologia e informação, auxiliar administrativo, auxiliar de produção, funcionário público, garçom, jovem aprendiz, monitor, programador e representante comercial, representaram 0,8% da amostra, cada uma.

Na Figura 16 estão disponibilizados os percentuais de respostas dos provadores quanto a frequência e consumo de café e iogurte, bem como os critérios

de escolha durante a compra.

Figura 16 - Percentual de respostas dos provadores para a frequência e consumo de café e iogurte e critérios de escolha durante a compra



Fonte: Autoria própria (2023)

Verificou-se que 88% dos participantes consomem café sendo que dentre esses consumidores a maioria (68,8%) realiza seu consumo diariamente. Além disso, 9,6% o consomem ocasionalmente, 7,2% uma vez por semana e 2,4% duas vezes por semana. Por outro lado, 12% afirmaram nunca consumir café.

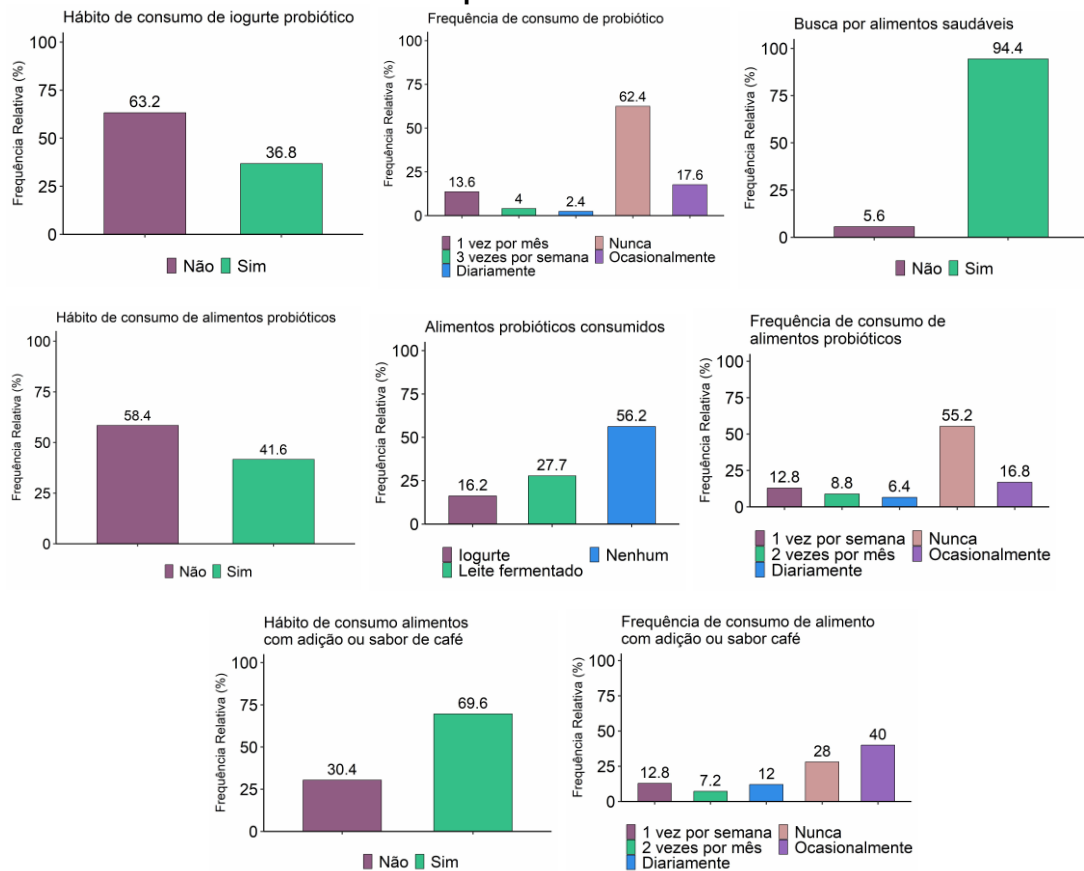
Ao serem questionados sobre o consumo de iogurte, 77,6% dos participantes afirmaram consumir, enquanto 22,4% responderam que não apresentam esse hábito. A frequência de consumo do iogurte entre os provadores variou, sendo que 27,2% o consomem uma vez por semana, 22,4% o consomem ocasionalmente, 21,6% nunca o consomem, 16,8% o consomem duas vezes por mês e 12% o consomem diariamente.

Quanto aos tipos de iogurte consumidos, a maioria prefere o natural integral (40,4%), seguido dos iogurtes grego (31,9%), natural desnatado (9,2%), zero lactose (5%), tradicional (4,3%), zero açúcar (3,5%), de leite vegetal (0,7%) e probiótico (0,7%). Dentre os critérios considerados na escolha desses alimentos, o preço foi mencionado

por 26,2% dos participantes, seguido do prazo de validade (21,1%), qualidade nutricional (18,4%), aparência (17,2%), marca (14,8%), sabor (2%) e textura (0,4%).

A Figura 17 apresenta os percentuais de respostas dos provadores para frequência e consumo iogurte probiótico e produtos com adição ou sabor café além do interesse por alimentos saudáveis e probióticos.

Figura 17 - Percentual de respostas dos provadores para frequência e consumo iogurte probiótico e produtos com adição ou sabor café e interesse por alimentos saudáveis e probióticos



Fonte: Autoria própria (2023)

Verificou-se que 36,8% dos participantes responderam que possuem o hábito de consumir iogurte probiótico. A frequência de consumo foi de 17,6% para ocasionalmente, 13,6% para uma vez por mês, 4% para três vezes por semana e 2,4% para consumo diário. Por outro lado, 63,2% afirmaram não consumir iogurte probiótico.

Quando questionados quanto a busca por alimentos saudáveis, a maioria respondeu positivamente (94,4%). No que diz respeito ao hábito de consumo de alimentos probióticos, 58,4% dos participantes afirmaram não os consumir, enquanto 41,6% disseram que os consomem. Dentre os alimentos probióticos, os mais

populares foram o leite fermentado (27,7%) e o iogurte (16,2%). A frequência do hábito de consumo de alimentos probióticos variou de 16,8% para ocasionalmente, 12,8% para uma vez por semana, 8,8% para duas vezes por mês e 6,4% para consumo diário.

Por fim, a maioria dos participantes afirmou que possui o hábito de consumir alimentos com adição ou sabor de café (69,6%), sendo que a frequência variou de 40% para consumo ocasionalmente, 12,8% para consumo uma vez por semana, 12% para consumo diariamente e 7,2% para consumo duas vezes por mês.

5.5.2 Teste de aceitação

Os resultados da avaliação sensorial aplicada a 120 provadores não treinados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do teste de escala hedônica de quatro ensaios de iogurte

Atributos	Valores sensoriais médios			
	P	PEC	PLaBal	PLaBalEC
Aparência	8,18 ± 1,00 ^{ab}	7,62 ± 1,46 ^c	8,26 ± 1,01 ^a	7,78 ± 1,54 ^{bc}
Aroma	7,43 ± 1,58 ^b	7,89 ± 1,41 ^{ab}	7,50 ± 1,57 ^b	8,04 ± 1,17 ^a
Cor	8,07 ± 1,11 ^a	7,89 ± 1,32 ^a	8,14 ± 1,11 ^a	7,92 ± 1,35 ^a
Sabor	8,14 ± 1,14 ^a	6,16 ± 2,04 ^b	8,26 ± 1,07 ^a	6,66 ± 1,88 ^b
Textura	8,03 ± 1,24 ^a	6,78 ± 1,59 ^c	8,05 ± 1,26 ^a	7,27 ± 1,65 ^b
Impressão global	8,06 ± 0,93 ^a	6,86 ± 1,55 ^b	8,08 ± 1,04 ^a	7,24 ± 1,46 ^b

^a Os resultados apresentam a média das notas da escala hedônica ± desvio padrão.

^b Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^c Ensaios do controle negativo: P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: A autoria própria (2023)

Observou-se para o atributo aparência, que os valores sensoriais médios foram de 7,62 a 8,26 situando-se entre as categorias “gostei moderadamente” e “gostei muito”. O ensaio P não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) de PLaBal e PLaBalEC. O mesmo foi observado para PEC e PLaBalEC, que não diferiram entre si. Entretanto, houve diferença estatística entre PEC e P e PEC e PLaBal, assim como entre PLaBal e PLaBalEC nesse atributo.

Para o atributo aroma os valores sensoriais médios foram de 7,43 a 8,04, onde as formulações apresentaram-se nas categorias “gostei moderadamente” e “gostei muito”. Verificou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre P, PEC e PLaBal. Os ensaios PEC e PLaBalEC também não diferiram entre si.

No atributo de cor os ensaios não diferiram entre si ($p > 0,05$) e tiveram valores sensoriais médios de 7,89 a 8,14, situando-se entre as categorias “gostei

moderadamente” e “gostei muito”.

Considerando-se o atributo sabor, notou-se que os ensaios situaram-se entre as categorias “gostei ligeiramente” e “gostei muito”, com valores sensoriais médios de 6,16 a 8,26. Os ensaios P e PLaBal não diferiram entre si ($p > 0,05$), assim como PEC e PLaBalEC.

Em relação ao atributo textura verificou-se que os ensaios apresentaram-se nas categorias “gostei ligeiramente”, “gostei moderadamente” e “gostei muito”, com valores sensoriais médios de 6,78 a 8,05. Apenas P e PLaBal não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Quanto a impressão global os ensaios apresentaram valores sensoriais médios de 6,86 a 8,08 nas categorias “gostei ligeiramente”, “gostei moderadamente” e “gostei muito”. Os ensaios P e PLaBal não diferiram entre si ($p > 0,05$), do mesmo modo PEC e PLaBalEC também não diferiram entre si.

De maneira geral, os ensaios P e PLaBal tiveram melhor aceitação pelos provadores, com valores sensoriais médios $\geq 7,43$. Esses resultados corroboram com os obtidos por Majchrzak, Lahm e Durrschmid (2009) que examinaram três iogurtes probióticos e seis iogurtes convencionais quanto às suas propriedades sensoriais e preferências dos consumidores. Para tanto, provadores treinados avaliaram a qualidade geral das amostras classificando-as quanto à intensidade dos descritores sensoriais em uma escala de 10 unidades. Com base nos resultados da avaliação sensorial descritiva e do teste de diferenças pareadas, verificaram que não houve diferenças significativas nas preferências dos consumidores entre os iogurtes probióticos e os iogurtes convencionais.

A menor aceitação para o sabor observada para PEC (6,16) e PLaBalEC (6,66) pode estar relacionada ao fato de que 40,4% dos provadores preferem consumir iogurte natural integral e que apesar de 88% consumirem café, a concentração de extrato e/ou a combinação podem não ter agradado ao paladar por se tratar de um alimento diferenciado. Da Fonseca *et al.* (2007) e Fernandes *et al.* (2013) salientam que a concentração de café pode influenciar na aceitação sensorial de um alimento devido ao sabor amargo e adstringência conferidos pela presença de cafeína, ácidos clorogênicos e demais compostos presentes no café. Silva *et al.* (2021) ao avaliarem sensorialmente iogurte tipo grego sabor café, verificaram que a amostra obteve uma aparência agradável perante os julgadores, seguido dos atributos aroma, textura e

impressão global. O atributo sabor obteve os menores valores, o que foi atribuído à concentração de café utilizada (1,5% de café solúvel).

Tan e Korel (2007) formularam sete iogurtes com diferentes concentrações de café solúvel de 0 - 0,9% e açúcar de 0 - 5% (A). As formulações foram avaliadas quanto aos atributos sensoriais de aparência, odor, consistência, sabor e impressão global por provadores treinados utilizando-se uma escala hedônica descritiva de 5 pontos. Verificou-se que as maiores notas foram atribuídas para o iogurte com 0,5% de café e contendo 5% de açúcar. Para os atributos consistência, sabor e impressão global identificou-se diferença significativa entre os iogurtes com redução nas pontuações conforme aumentou a concentração de café nas amostras.

Ribeiro, Bosi e Lucia (2017) avaliaram sensorialmente uma amostra de iogurte com 0,1 % de extrato de café e verificaram que houve uma boa aceitação entre os consumidores com valores médios de 7,6 para cor, 7,7 para consistência e sabor, 8,1 para aroma e 7,8 para impressão global. Gonçalves (2009) avaliou quatro formulações de bebida à base de café com diferentes concentrações (0,7; 1,0; 1,3; 1,6% de extrato de café). O autor não identificou diferença significativa entre as formulações e destacou que as médias dos atributos ficaram entre 6,9 e 7,2, o que correspondeu a “gostei ligeiramente” e “gostei muito”.

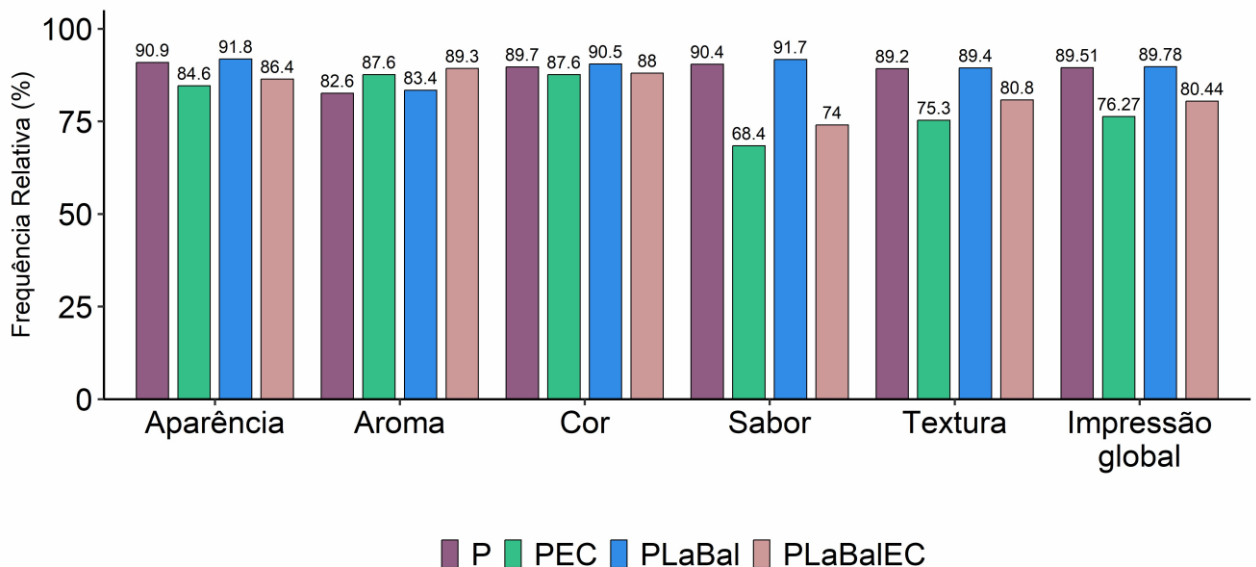
Slyvka e Skulska (2021) desenvolveram quatro formulações de iogurte com diferentes concentrações de café solúvel, açúcar e concentrado proteico de soro de leite (C1 com 0% café, 0% açúcar, 0% concentrado proteico; C2 com 0,5% café, 4% açúcar, 5% concentrado proteico; C3 com 0,7% café, 5% açúcar, 10% concentrado proteico; C4 com 0,9% café, 6% açúcar, 15% concentrado proteico). As formulações foram avaliadas por meio de uma escala de cinco pontos quanto aos atributos sensoriais aparência, aroma, consistência e sabor. As maiores médias foram atribuídas para a aparência e aroma, entretanto para consistência e sabor houve diferença significativa entre os iogurtes com redução nas notas a medida em que houve aumento da concentração de café.

Ferreira *et al.* (2009) avaliaram a aceitação sensorial de doce de leite com café e soro de leite. Produziram amostras variando a concentração de soro (S) e de café (C) obtendo seis formulações (T1 0% S e 1% C; T2 0% S e 1,5% C; T3 10% S e 1% C; T4 10% S e 1,5% C; T5 20% S e 1% C; T6 20% S e 1,5% C). Considerando-se as notas médias, os autores observaram que os doces se destacaram pela boa aceitação, apresentando em média notas superiores a 7 para os atributos sensoriais.

Além disso, perceberam que, em geral, o tratamento 6 foi o que apresentou as menores notas, mesmo assim superiores a 6, o que representa na escala hedônica um valor considerável. As menores notas atribuídas à T6 podem ser explicadas pelo fato dessa amostra apresentar a maior concentração de soro e café, o que pode acarretar alterações nos parâmetros avaliados.

Na Figura 18 podem ser observados os índices de aceitabilidade das quatro amostras de iogurte em relação aos atributos sensoriais avaliados.

Figura 18 - Índice de aceitabilidade dos atributos aparência, aroma, cor, sabor, textura e impressão global dos quatro ensaios de iogurte



^a Ensaios do controle negativo: P: padrão; PEC: padrão + extrato de café; PLaBal: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; PLaBalEC: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

^b Índice de aceitabilidade calculado a partir dos resultados da escala hedônica.

Fonte: Autoria própria (2023)

A partir do gráfico da Figura 18 pode-se observar que para todos os atributos sensoriais avaliados pelos provadores, os ensaios que contêm extrato de café (PEC e PLaBalEC) tiveram índices de aceitação menores em comparação aos que não o contêm (P e PLaBal). No entanto, o atributo aroma foi uma exceção, onde o iogurte probiótico com adição de extrato de café (PLaBalEC) teve índices de aceitação mais altos. Além disso, é interessante notar que o sabor foi o atributo em que os iogurtes com adição de extrato de café receberam índices de aceitação mais baixos.

Verificou-se que os ensaios P, PLaBal e PLaBalEC tiveram índices de aceitabilidade superiores a 73%, enquanto PEC teve índices de aceitabilidade entre 68,4 e 87,6%. Considerando-se que índices superiores a 70% são considerados como bem aceitos pelo mercado consumidor (TEIXEIRA; MEINERT; BARBETTA, 1987;

DUTCOSKY, 1996), pode-se dizer que todos os tratamentos teriam repercussão favorável, exceto PEC, que para sabor apresentou índice de aceitabilidade inferior a 70%.

Fernandes *et al.* (2013) ao elaborarem três formulações de iogurte com diferentes concentrações de café solúvel (0,2%, 0,4% e 0,6%) utilizaram a escala hedônica de 9 pontos para avaliação sensorial das amostras. Os autores obtiveram índice de aceitabilidade de 78,91%, 73,15% e 67,72% para os iogurtes contendo 0,2%, 0,4% e 0,6% de café solúvel, respectivamente, sendo que a maior aceitabilidade sensorial pelos provadores foi para iogurte na concentração de 0,2%.

Galvão *et al.* (2017) formularam iogurte grego com café (5% café solúvel), chocolate (5% cacau) e canela (0,5%). Os autores utilizaram a escala hedônica de 9 pontos para avaliar a aceitação sensorial dos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global do produto, além do índice de aceitabilidade e a intenção de compra. Verificou-se aceitação de 96,7% para aparência, 90,0% para aroma, 93,3% para sabor, 95,5% para textura e 94,4% para impressão global. O índice de aceitabilidade apresentou valor acima de 70%, o que correspondeu a uma ótima aceitação do produto. Em relação a intenção de compra, 66% dos provadores disseram que certamente comprariam o produto.

5.5.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

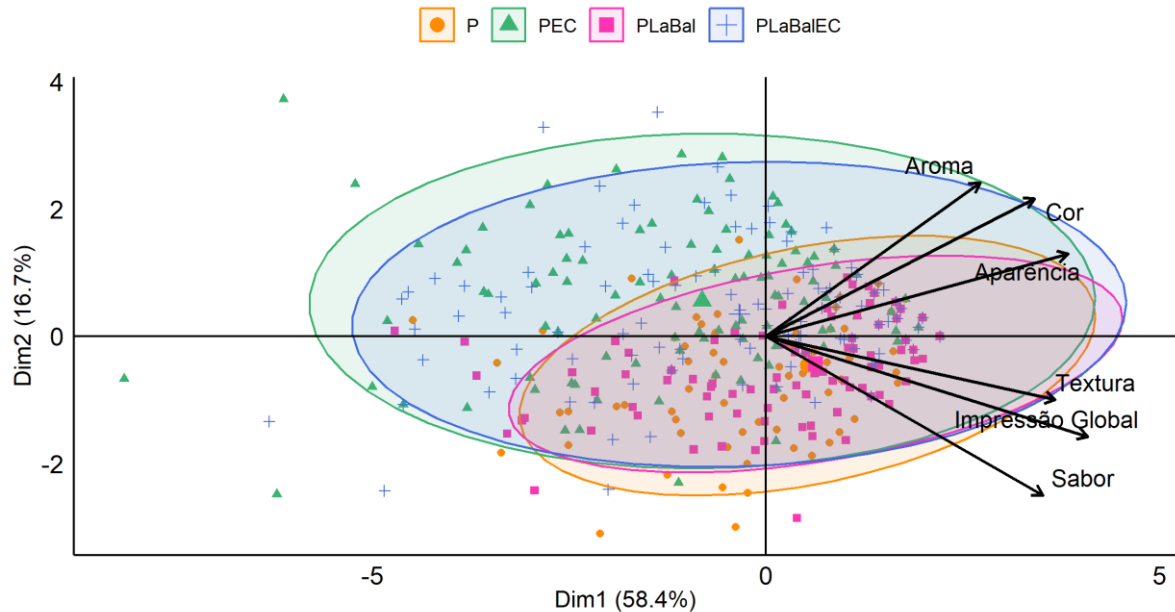
A Análise de Componentes Principais (ACP) é apresentada com duas dimensões, as quais representam juntas 75,09% da variação dos dados observados (Figura 19).

A primeira dimensão (Dim1) da ACP é composta principalmente pelos atributos impressão global, aparência e textura (Autovalor = 3,50; variabilidade = 58,36%). Nesta dimensão, todas as variáveis de maior contribuição apresentaram correlações positivas e significativas ($p < 0,05$), estando representadas pelas cargas fatoriais positivas da Dimensão 1. Pode-se afirmar que os atributos impressão global e aparência apresentam coeficiente de correlação igual a 0,59; impressão global e textura de 0,67 e; aparência e textura de 0,57 (Figura 20).

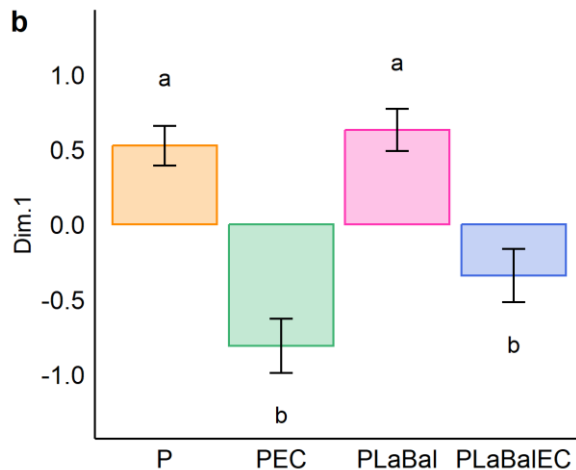
Figura 19 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos atributos aparência, aroma, cor,

sabor, textura e impressão global de quatro ensaios de iogurte

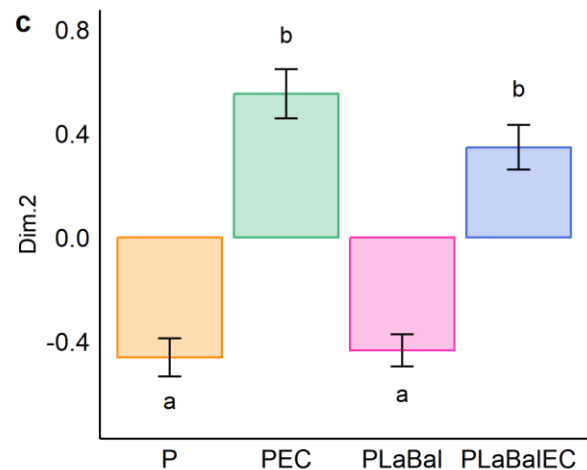
a



b



c



^a O gráfico de elipse (a) apresenta duas dimensões (eixos x e y), onde cada cor representa grupos distintos. Setas pretas indicam vetores das variáveis (atributos sensoriais) de avaliação dos provadores.

^b Os gráficos de barras em (b) representam as médias e desvios padrão da Dimensão 1 para cada ensaio.

^c Os gráficos de barras em (c) representam as médias e desvios padrão da Dimensão 2 para cada ensaio.

^d Letras diferentes acima das barras indicam haver diferença significativa entre os ensaios ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

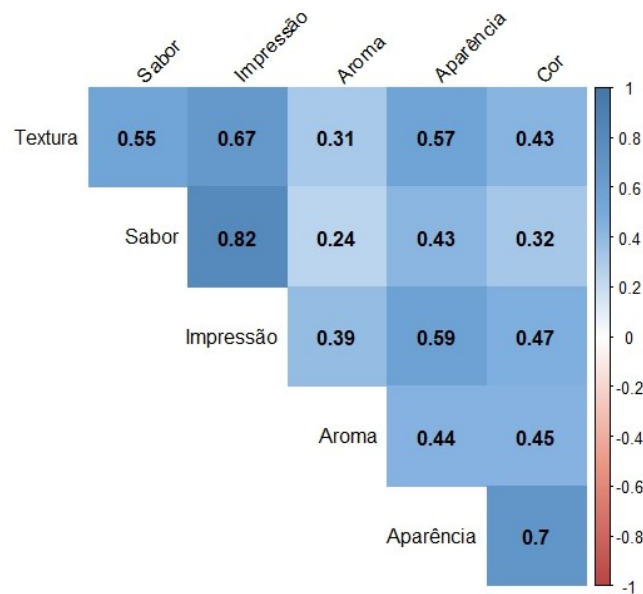
^e Ensaios do controle negativo: *P*: padrão; *PEC*: padrão + extrato de café; *PLaBal*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; *PLaBalEC*: padrão + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* + extrato de café.

Fonte: Autoria própria (2023)

A segunda dimensão (Dim2) é composta pelos atributos sabor, cor e aroma (Autovalor = 1,00; variabilidade = 16,36%). Nesta dimensão foi verificado que o

coeficiente de correlação de sabor e cor foi igual a 0,32; sabor e aroma de 0,24 e; aroma e cor de 0,45 (Figura 20). Apesar de todos estarem diretamente relacionados, os atributos cor e aroma foram melhor representados pelas cargas fatoriais positivas da Dimensão 2, enquanto sabor pelas cargas fatoriais negativas, sendo tais correlações significativas (Figura 20).

Figura 20 - Correlograma no qual cada intersecção indica a associação entre dois atributos sensoriais, independente do ensaio



Fonte: Autoria própria (2023)

Na Figura 19a é apresentado um diagrama que representa a ordenação dos autovalores e autovetores da Análise de Componentes Principais. As elipses presentes no gráfico possibilitam a separação dos ensaios P, PEC, PLaBal e PLaBalEC. Ao examinar as cargas fatoriais da Dimensão 1 foi possível observar que os ensaios que não possuem extrato de café (P e PLaBal) apresentam maiores valores para os atributos impressão global, aparência e textura ($F_{1,496} = 52,645$, $p < 0,0001$), conforme indicado pelas setas que apontam em direção a esses ensaios. A presença de microrganismos probióticos não mostrou significância estatística na variação das cargas fatoriais da Dimensão 1 ($F_{1,496} = 3,251$; $p = 0,072$), assim como a interação de extrato de café (EC) e probióticos ($F_{1,496} = 1,317$; $p = 0,252$) (Figura 19a).

No que se refere à Dimensão 2, observa-se que o atributo sabor possui valores maiores nos ensaios sem extrato de café (P e PLaBal), enquanto para aroma

e cor os valores maiores foram observados para os ensaios com extrato de café (PEC e PLaBalEC).

A partir da Figura 19 (b e c) pode-se verificar que houve diferença estatística significativa entre os ensaios apenas em relação ao fator extrato de café, em ambas as dimensões, pois P e PLaBal não diferiram entre si, sendo o mesmo observado para PEC e PLaBalEC, conforme indicam os resultados do teste de Tukey.

6 CONCLUSÕES

Verificou-se que não houve atuação do extrato de café sobre o crescimento dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* presentes nas formulações do iogurte. O mesmo comportamento foi observado no acompanhamento do crescimento dos microrganismos da cultura *starter* (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) durante os 42 dias de armazenamento. Além disso, os oitos ensaios estiveram de acordo com os requisitos microbiológicos estabelecidos pela legislação para as contagens desses microrganismos.

Entretanto, verificou-se inibição do crescimento dos microrganismos patogênicos nas duas últimas semanas de acompanhamento (T6 e T7), o que permite inferir que houve atuação do extrato sobre o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Para bolores e leveduras, não houve crescimento celular durante a estocagem, assim não foi possível identificar a atuação do extrato de café sobre sua multiplicação.

Em relação à composição química, propriedades físico-químicas e perfil de textura e viscosidade verificou-se que os oito ensaios de iogurte elaborados foram classificados como iogurte integral quanto ao teor de lipídeos, além de apresentarem-se em conformidade com a legislação brasileira para o teor de proteínas e acidez e; ainda mantiveram-se de acordo com os aspectos tecnológicos para o desenvolvimento de iogurtes.

Para os atributos sensoriais os ensaios com extrato de café (PEC e PLaBaEC) tiveram índices de aceitabilidade menores em comparação aos que não o continham, exceto para o atributo aroma, onde o iogurte probiótico com adição de extrato café apresentou índice de aceitabilidade maior. Considerando-se que os atributos com índices superiores a 70% serão bem aceitos pelo mercado consumidor, pode-se dizer que todos os ensaios analisados poderão ter repercussão favorável, exceto para PEC, onde sabor apresentou índice de aceitabilidade inferior ao percentual mencionado.

Os resultados revelaram que o extrato de café canéfora consiste em uma opção de uso como agente antimicrobiano no controle de patógenos em produtos lácteos fermentados contendo microrganismos probióticos, e também indica o seu potencial sob o ponto de vista tecnológico, especialmente de saborização e aromatização, para aplicação em outras matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, S. M.; EDRIS, A. E.; SADEK, Z. Novel approach for the inhibition of *Helicobacter pylori* contamination in yogurt using selected probiotics combined with eugenol and cinnamaldehyde nanoemulsions. **Food Chemistry**, Dresden, v. 417, p. 346-388, 2023.
- ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 31, p. 877-902, 2013.
- AGNOLETTI, B. Z. **Avaliação das propriedades físico-químicas de café arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*), classificados quanto à qualidade da bebida**. 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.
- ALENISAN, M. A.; *et al.* Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**, Bahrain, v. 24, p. 101-106, 2017.
- ALMEIDA, A. A. P.; *et al.* Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Granada, v. 54, p. 8738-8743, 2006.
- ÁLVAREZ, B.; *et al.* An exopolysaccharide-deficient mutant of *Lactobacillus rhamnosus* GG efficiently displays a protective llama antibody fragment against rotavirus on its surface. **Applied and Environmental Microbiology**, Ann Arbor, v. 81, n. 17, p. 5784-5793, 2015.
- ALVAREZ, M. V.; MOREIRA, M. R.; PONCE, A. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. **Journal of Food Safety**, Hoboken, v. 32, n. 3, p. 379-387, 2012.
- ANTUNES, A. E. C. **Influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- AQUINO, C. F.; SALOMÃO, L. C. C.; AZEVEDO, A. M. Fenotipagem de alta eficiência para vitamina A em banana utilizando redes neurais artificiais e dados colorimétricos. **Bragantia**, Campinas, v. 75, p. 268-274, 2016.
- ARAÚJO T. F.; *et al.* Desenvolvimento de iogurte tipo *sundae* sabor maracujá feito a partir de leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 384, p. 48-54, 2012.
- ARDITA, C. S.; *et al.* Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 16, p. 5068-5077, 2014.
- ARYANA, K. J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 40, p. 1808-

1814, 2007.

ARYANA, K. J.; *et al.* Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 3, p. 79-84, 2007.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - A review. **International Journal of Food Microbiology**, Utrecht, v. 149, p. 194-208, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Washington: AOAC, 1995.

ATLAS, R. M. Probiotics-snake oil for the new millennium? **Environmental Microbiology**, London, v. 1, n. 5, p. 377-382, 1999.

ATTOKARAN, M. **Natural food flavors and colorants**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017.

AZAM, S.; *et al.* Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, Nova York, v. 9, n. 9, p. 325-355, 2003.

AZIMAN, N.; *et al.* Phytochemical Profiles and Antimicrobial Activity of Aromatic Malaysian Herb Extracts against Food-Borne Pathogenic and Food Spoilage Microorganisms. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 583-592, 2014.

BAI, M.; *et al.* Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang improved the properties of stirred yogurt. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 37, p. 1-8, 2020.

BAKER, M.T.; *et al.* Investigating the Effect of Consumers Knowledge on Their Acceptance of Functional Foods: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Foods**, Basel, n. 11, p. 1135, 2022.

BAKIRCI, I.; KAVAZ, A. An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. **International Journal of Dairy Technology**, Launceston, v. 61, n. 3, p. 136-144, 2008.

BALLINI, A.; *et al.* About Functional Foods: The Probiotics and Prebiotics State of Art. **Antibiotics**, Basel, v. 12, n. 4, p. 635, 2023.

BAO, N.; CHEN, F.; DAI, D. The regulation of host intestinal microbiota by polyphenols in the development and prevention of chronic kidney disease. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, p. 2981, 2019.

BARBA, F. J.; *et al.* **Innovative Technologies for Food Preservation**: Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms. Cambridge: Academic Press, 2017.

BARBOSA, P. D. P. M.; GALLINA, D. A. Viabilidade de bactérias (*starter* e probióticas) em bebidas elaboradas com iogurte e polpa de manga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 2, p. 85-95, 2017.

BATES, D. M. B. S.; *et al.* Fitting linear mixed-effects models using lme4. **Journal of**

Statistical Software, Los Angeles, v. 67, p. 1-48, 2015.

BAUTISTA-GALLEGO, J.; *et al.* Diversity and functional characterization of *Lactobacillus* spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Utrecht, v. 181, p. 60-66, 2014.

BAZZAZ, B. S. F.; *et al.* Effects of omeprazole and caffeine alone and in combination with gentamicin and ciprofloxacin against antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. **Journal of Pharmacopuncture**, Seoul, v. 22, n. 1, p. 49, 2019.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**, 4 ed. Berlin: Springer, 2009.

BENGUEDOUAR, K.; *et al.* Evaluation of the antioxidant properties and total phenolic content of a dairy product (yogurt) supplemented with *Thymus wilddenowii* essential oil from Algeria. **Journal of Food Measurement and Characterization**, Berlim, v. 16, n. 5, p. 3568-3577, 2022.

BERG, R. D. Probiotics, prebiotics or conbiotics? **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 89-92, 1998.

BERTOLINO, M.; *et al.* Coffee silverskin as nutraceutical ingredient in yogurt: Its effect on functional properties and its bioaccessibility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 99, n. 9, p. 4267-4275, 2019.

BIDOL, S. A.; *et al.* Multistate outbreaks of Salmonella infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants - United States, 2005-2006. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 56, n. 35, p. 909-911, 2007.

BORRELLI, R. C.; FOGLIANO, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. **Molecular Nutrition & Food Research**, Hoboken, v. 49, n. 7, p. 673-678, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. **Instrução Normativa nº 161 de 01 de julho de 2022**. Estabelece os padrões microbiológicos de alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ed. 126, seção 1, p.235, Poder Executivo: Brasília, DF, 01 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **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. Diário Oficial da União, Brasília, 24 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2018**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 13 jul. 2018.

BRIDSON, D. M. Nomenclatural notes on psilanthus, including coffea sect. Paracoffea (Rubiaceae Tribe Coffeae). **Kew Bulletin**, Berlim, v.42, n.2, p. 453-460, 1987.

BURT, S. A.; *et al.* The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-6, 2014.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 51, p. 363-373, 2011.

CALDAS, A. F. **Avaliação das Propriedades Antioxidantes do Bagaço de Mirtilo com Potencial Conservante Alimentar**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição). Programa de Pós-Graduação em Ciências do Consumo e Nutrição. Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território. Faculdade de Ciência Universidade do Porto, Cidade do Porto, 2014.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 94, p. 167-174, 2003.

CANCI, L. A.; *et al.* Antimicrobial potential of aqueous coffee extracts against pathogens and *Lactobacillus* species: A food matrix application. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 47, p. 1-8, 2022.

CARDOSO, R. C.; *et al.* Avaliação físico-química e sensorial de iogurte fornecido a escolares. **HOLOS**, Natal, v. 6, n. 38, p. 1-7, 2022.

CAROCHO, M.; *et al.* Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, Wageningen, v. 71, p. 107-120, 2018.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis. **Trends in Food Science e Technology**, Wageningen, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial a espécie arábica: Origem e classificação botânica do *C. arabica* L. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 21 n. 230, p. 174-184, 1946.

CASTEELE, S. V.; *et al.* Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, Launceston, v. 16, n. 12, p. 1470-1476, 2006.

CASTILLO, M. D. D.; GORDON, M. H.; AMES, J. M. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, p. 471-477, 2005.

CEAPA, C.; *et al.* The Variable Regions of *Lactobacillus rhamnosus* Genomes Reveal the Dynamic Evolution of Metabolic and Host-Adaptation Repertoires. **Genome Biology and Evolution**, Washington, v. 8, n. 6, p. 1889-1905, 2016.

- CHAN, M. Z. A.; LIU, S. Q. Coffee brews as food matrices for delivering probiotics: Opportunities, challenges, and potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, Wageningen, v. 119, p. 227-242, 2022.
- CHLEBICZ, A.; ŚLIŻEWSKA, K. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 15, p. 863, 2018.
- CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 2 ed. Boca Raton: CbC Press, 1987.
- CLEVELAND, J.; *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.
- CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. *In*: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**, Berlim: Springer, 1985. p. 305-374.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjunturas a agropecuária: parâmetros de análise de mercado de café**. mai. 2023. Disponível em: <https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/conjunturas-da-agropecuaria-conab/>. Acesso em: 10 mai. 2023.
- CONTRERAS-CALDERÓN, J.; *et al.* of antioxidant capacity in coffees marketed in Colombia: Relationship with the extent of non-enzymatic browning. **Food Chemistry**, Dresden, v. 209, p. 162-170, 2016.
- COOPER, G. **Food Microbiology**. New York: Larsen and Keller Education, 2019.
- CORSO, M. P.; VIGNOLI, J. A.; BENASSI, M. T. Development of an instant enriched with chlorogenic acids. **Journal of Food Science and Technology**, Mysuru, v. 53, n. 3, p. 1380-1388, 2016.
- COSTA, G. N. S.; *et al.* Desenvolvimento de um logurte Sabor Juçuí (*Euterpe edulis* Martius): Avaliação Físico-química e Sensorial. **Revista Eletrônica TECCEN**, Vassouras, v. 5, n. 2 p. 43-58, 2012.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 777-788, 2005.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocinas - uma alternativa viável aos antibióticos? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, p. 95-105, 2013.
- CURTI, V.; *et al.* *In vivo* Modulatory Effect of Coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) on the Expression Levels of Murine microRNA-124-3p Associated with Antioxidant Defenses. **eFood**, Nanjing, v. 1, n. 2, p. 140-146, 2020.
- DA FONSECA, A. F. A.; *et al.* Qualidade do café conilon: operações de colheita e pós-colheita. *In*: FERRAO, R. G.; *et al.* **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2007. p. 501-520.
- DA SILVA, N.; *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5 ed., São Paulo: Editora Blucher, 2017.

- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 79, p. 1524-1536, 1996.
- DAVIS, A. P.; RAKOTONASOLO, F. Six new species of coffee (*Coffea*) from northern Madagascar. **Kew Bulletin**, Berlim, v. 76, n. 3, p. 497-511, 2021.
- DEMIRKOL, M.; TARAKCI, Z. Effect of grape (*Vitis labrusca* L.) pomace dried by different methods on physicochemical, microbiological and bioactive properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 97, p. 770-777, 2018.
- DESHWAL, G. K.; *et al.* Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products. **Trends in Food Science & Technology**, Wageningen, v. 109, p. 499-512, 2021.
- DIAS, J. G.; *et al.* Avaliação da estabilidade de iogurte concentrado salgado adicionado com orégano durante o armazenamento. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v.9, n.10, p. 1-26, 2020.
- DONG, W.; *et al.* Characterization of fatty acid, amino acid and volatile compound compositions and bioactive components of seven coffee (*Coffea robusta*) cultivars grown in Hainan Province, China. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 9, p. 16687-16708, 2015.
- DÖNMEZ, Ö.; MOGOL, B. A.; GÖKMEN, V. Syneresis and rheological behaviors of set yogurt containing green tea and green coffee powders. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 100, n. 2, p. 901-907, 2017.
- DOROTA M.; BIRGIT L.; KLAUS D. Conventional and probiotic yogurts differ in sensory properties but not in consumers preferences. **Journal of Sensory Studies**, Hoboken, v. 25, n. 3, p. 431-446, 2010.
- DUANGJAI A.; *et al.* Comparison of antioxidant, antimicrobial activities, and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. **Integrative Medicine Research**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 324-331, 2016.
- DUBOC, P.; BEAT, M. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.11, n.10, p.759-768, 2001.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de Alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013.
- ERTEM, H.; ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and Gobdin. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 776-783, 2018.
- ESMAEILI, S. A.; *et al.* Generation of tolerogenic dendritic cells using *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus delbrueckii* as tolerogenic probiotics. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 119, n. 9, p. 7865-7872, 2018.
- EZAKI, T. Ruminococcus. *In*: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and**

Bacteria. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015. p. 1-5.

FARAH, A. Nutritional and health aspects of coffee. *In* CHU, Y. F. **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**, New York: IFT Press and John Wiley & Sons, 2012; p. 21.

FARNSWORTH, J. P.; LI, J.; HENDRICKS, G. M.; GUO, M. R. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. **Small Ruminant Research**, Little Rock, v. 65, p. 113-121, 2006.

FDA. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. **Bacteriological Analytical Manual**: enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. 8 ed., Washington: FDA, 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>. Acesso em: 14 de junho de 2023.

FENG, J.; *et al.* Screening of immunomodulatory and adhesive *Lactobacillus* with antagonistic activities against *Salmonella* from fermented vegetables. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 12, n. 31, p. 1947-1954, 2015.

FENSTER, K.; *et al.* The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. **Microorganisms**, Basel, v. 83, n. 7, p. 156-171, 2019.

FERNANDES, A. F. C.; *et al.* Aceitabilidade sensorial e intenção de compra de iogurte sabor café. *In*: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA E SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO IFSULDEMINAS. 5; 2., 2013, Inconfidentes. **Anais [...]** Inconfidentes: IFSULDEMINAS, 2013. p. 1-6.

FERNANDES, A. F. C.; *et al.* Vida de prateleira de iogurte sabor café. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 4, p. 538-543, 2016.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt**: Pacote Experimental Designs (Portugues). R package version 1.2.2, 2022.

FERREIRA, L. O.; *et al.* Avaliação sensorial de doce de café com diferentes concentrações de café e soro. *In*: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 6., 2009, Vitória. **Anais [...]** Brasília: Embrapa - Café, 2009.

FONSECA, C. M.; *et al.* Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1829-1836, 2014.

FORSSTEN, S. D.; SINDELAR, C. W.; OUWEHAND, A. C. Probiotics from an industrial perspective. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 410-413, 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FULLER, R. **Probiotics**: The Scientific basis. London: Chapman and Hall, 1992.

FUSTER, M. D.; *et al.* Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Granada, v. 48, n. 11, p. 5600-5603, 2000.

- GAASTRA, W.; *et al.* *Escherichia fergusonii*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 172, p. 7-12, 2014.
- GALVÃO, R. N.; *et al.* Avaliação sensorial de iogurte grego com café, chocolate e canela. *In*: ANAIS DO SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 2017, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: Galoá, 2017. Disponível em: <https://proceedings.science/slaca/slaca-2017/papers/avaliacao-sensorial-de-iogurte-grego-com-cafe-chocolate-e-canela?lang=pt-br>. Acesso em: 08 jun. 2023.
- GARCÍA, C. E. V.; *et al.* Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 6, p. 2050-2062, 2015.
- GARRIGUES, G. Characterizing the Propionibacterium load in revision shoulder arthroplasty: a study of 137 culture-positive cases. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, Needham, v. 99, n. 2, p. 150-154, 2017.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.
- GOLDENBERG, J. Z.; *et al.* Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Hoboken, v.12, n.19, p. 342-354, 2017.
- GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 98-107, 2015.
- GONÇALVES, A. C. A. **Desenvolvimento de bebida à base de café adicionada de concentrado proteico de soro**: da pesquisa mercadológica à avaliação sensorial. 2009. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- GULARTE M. A. **Análise sensorial**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária PREC, 2009.
- GÜLER, Z.; PARK, Y. Characteristics of physico-chemical properties, volatile compounds and free fatty acid profiles of commercial set-type Turkish yogurts. **Open Journal of Animal Sciences**, Pequim, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.
- HARIADI, H.; *et al.* Effect in Ultrasound Usage Time on Chemical and Organoleptic Properties of Robusta Coffee Powder (*Coffea canephora*. L). *In*: IOP CONFERENCE SERIES: EARTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE. 1. 2022, Londres. **Anais [...]** Londres: IOP Science, 2022. p. 6.
- HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005.
- HERRERA, M.; *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 enhances systemic and respiratory innate immune response in immunocompromised malnourished mice. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 1693-1704, 2013.

HILL, C.; *et al.* International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, n. 11, p. 506-514, 2014.

HU, G. L.; *et al.* The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food & Function**, London, v. 10, n. 6, p. 3113-3126, 2019.

HUI, Y. H.; EVRANUZ, E. Ö. **Handbook of animal-based fermented food and beverage technology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

IBARRA, A.; *et al.* Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 95, n. 7, p. 3536 - 3548, 2012.

IBRAHIM, S. A.; *et al.* Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. **Food Chemistry**, Dresden, v. 99, p. 645-650, 2006.

INCAPER. Capixaba Institute for Research. **Conilon coffee**. 3 ed. Vitória: Incaper, 2019.

ISANGA, J.; ZHANG, G. Production and evaluation of some physicochemical parameters of peanut milk yoghurt. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 42, n. 6, p. 1132-1138, 2009.

ISO 11133:2014. **Microbiology of food, animal feed and water**. Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Genebra: ISO, 2014.

ITC. International Trade Centre. **The coffee exporter's guide**. 3 ed. Geneva. 2011. Disponível em: <http://www.intracen.org/The-Coffee-Exporters-Guide>. Acesso em 09 de maio de 2023.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: "*Enterobacterales*"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 34, n. 2, p. 235-248, 2021.

JANG, H.; *et al.* Chlorogenic acid and coffee prevent hypoxia-induced retinal degeneration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Granada, v. 62, n. 1, p. 182-191, 2014.

JI, Q.; *et al.* Protective Effects of Chlorogenic Acid on Inflammatory Responses Induced by *Staphylococcus Aureus* and Milk Protein Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v. 171, p. 1-12, 2022.

JIANG, M.; *et al.* Evaluation of the antioxidative, antibacterial, and anti-inflammatory effects of the aloe fermentation supernatant containing *Lactobacillus plantarum* HM218749.1. **Mediators of Inflammation**, London, n. 1, p. 35-47, 2016.

JIMÉNEZ-ZAMORA, A.; PASTORIZA, S.; RUFÍAN-HENARES, J. A. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 61, n. 1, p. 12-18, 2015.

- JOYNER, H. S. **Rheology of Semisolid Foods**. Moscow - Idaho: Springer, 2019.
- JUNSATHIAN, P.; *et al.* Biological and neuroprotective activity of Thai edible plant extracts. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 124, p. 548-554, 2018.
- KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.
- KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, v. 41, n. 7, p. 1317-1322, 2008.
- KALSCHNE, D. L.; *et al.* Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. **Meat Science**, Amsterdam, v. 98, n. 4, p. 744-752, 2014.
- KANG, T. M.; *et al.* The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in *Escherichia coli*: caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in *Escherichia coli* and *Bacillus anthracis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 6, p. 3216-3223, 2012.
- KANO, H.; *et al.* Oral administration of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus OLL1073R-1 suppresses inflammation by decreasing interleukin-6 responses in a murine model of atopic dermatitis. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 96, n. 6, p. 3525-3534, 2013.
- KARAM, M. C.; *et al.* Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 80, n. 4, p. 400-409, 2013.
- KEMGANG, T. S.; *et al.* Leite fermentado com probiótico *Lactobacillus rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) protege camundongos da salmonela aumentando os mecanismos de proteção imune e não imune no nível da mucosa intestinal. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Amsterdam, v. 30, p. 62-73, 2016.
- KHAN, F. A.; MAALIK, A.; MURTAZA, G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. **Journal of Food and Drug Analysis**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 695-702, 2016.
- KUHLMANN, W.; *et al.* The mutagenic action of caffeine in higher organisms. **Cancer Research**, London, v. 28, n. 11, p. 2375-2389, 1968.
- LABBE, R. G.; NOLAN, L. L. Inhibition of macromolecular synthesis by caffeine in *Clostridium perfringens*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, n. 7, p. 589-592, 1987.
- LACHNO, A. S.; *et al.* Bioaditivos e aditivos naturais em alimentos: Corantes, antioxidantes e aromatizantes. **Boletim Técnico-Científico**, Farroupilha, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2019.
- LAI, P. Y.; HOW, H.; PUI, L. P. Microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* Bi-07 with galaactooligosaccharides using co-extrusion technique. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Biosciences**, Nitra, v. 11, n. 6, p. 1-7, 2022.

- LANGNER, E.; RZESKI, W. Biological properties of melanoidins: a review. **International Journal of Food Properties**, London, v. 17, n. 2, p. 344-553, 2013.
- LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L. J. Lithium Chloride-Sodium Propionate Agar for the Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 75, p.1192-1196, 1992.
- LEAHY, S. C.; *et al.* Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 98, p.1303-1315, 2005.
- LEE, B.; LEE, D. G. Depletion of reactive oxygen species induced by chlorogenic acid triggers apoptosis-like death in *Escherichia coli*. **Free Radical Research**, London, v. 52, p. 605-615, 2018.
- LI, G.; *et al.* Antimicrobial Effect and Mode of Action of Chlorogenic Acid on *Staphylococcus aureus*. **European Food Research & Technology**, Berlin, v. 238, n. 4, p. 589-596, 2014.
- LINARES, D. M.; ROSS, P.; STANTON, C. Beneficial microbes: the pharmacy in the intestino. **Bioengineered**, London, v. 7, n. 1, p.11-20, 2016.
- LIVRAMENTO, K. G.; *et al.* Proteomic analysis of coffee grains exposed to different drying process. **Food Chemistry**, Dresden, v. 221, p. 1874-1882, 2017.
- LOBO, V.; *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, Bangalore, v. 4, n. 8, p.118-126, 2010.
- LOU, Z.; *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 6, p. 398-403, 2011.
- LU, H.; *et al.* Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 19, n. 6, p. 3130-3158, 2020.
- LUCATTO, J. N.; *et al.* Performance of different microbial cultures in potentially probiotic and prebiotic yoghurts from cow and goat milks. **International Journal of Dairy Technology**, Launceston, v. 73, n. 1, p. 144-156, 2020.
- MAGALHÃES, M. L.; *et al.* Caracterização físico-química de iogurte de *blueberry* com baixo teor de gordura e enriquecido com fitoesteróis. *In*: SEMINÁRIO DOS ESTUDANTES DE PÓS-GRADUAÇÃO. 2. 2017, Bambuí. **Anais [...] Bambuí**: IFMG, 2017. p. 1-5.
- MAHARANI, M. B. S.; SOVIANA, S.; PISESTYANI, H. Examination of milk quality from milk shops in the residential areas of IPB dramaga and Cilibende. **Journal Kajian Veteriner**, Nusa, v. 8, n. 1, p. 24-33, 2020.
- MALARKANNAN, S. P.; PANDIYAN, C.; GEEWARGHESE, P. I. Certain physicochemical attributes of filled Yoghurt incorporated with coconut water. **Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Thrissur, v. 8, n. 1, p. 36-41, 2012.

MANCINI, R. S.; WANG, Y.; WEAVER, D. F. Phenylindanes in Brewed Coffee Inhibit Amyloid-Beta and Tau Aggregation. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, v 12, n. 735, p. 1-14, 2018.

MANTOVANI, D.; *et al.* Elaboração de iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais, análise físico-química e perfil da textura. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 34-42, 2012.

MARAFON, A. P. **Otimização das propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; *et al.* Assessment of Antimicrobial Activity of Coffee Brewed in Three Different Ways from Different Origins. **Food Research & Technology**, Berlin, v. 233, n.3, p. 497-505, 2011.

MARTINS, S. **Caracterização sensorial de smoothies de frutos tropicais com iogurte**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado de Engenharia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2005.

MARTINS, F. C. O.L.; SENTANIN, M. A.; SOUZA, D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. **Food Chemistry**, Dresden, v. 272, p. 732-750, 2019.

MATEJČEKOVÁ, Z.; *et al.* In Vitro Growth Competition of *Lactobacillus plantarum* HM1 with Pathogenic and Food Spoilage Microorganisms. **Journal of Food and Nutrition Research**, Cagayan de Oro City, v. 58, n. 3, p. 236-244, 2019.

MATTILA-SANDHOLM, T.; *et al.* Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, p. 173-182, 2002.

MAZLOOMI, S. M.; *et al.* Effect of adding inulin on microbial and physicochemical properties of low fat probiotic yoghurt. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz, v.12, n. 2, p. 93-98, 2011.

MEENAKSHI, S.; *et al.* Total flavanoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. **Global Journal of Pharmacology**, Jeddah, v. 3, n. 2, p. 59-62, 2009.

MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T; CIVILLE, G. V. **Técnicas de Avaliação Sensorial**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 1999.

MELO FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

MESÍAS, M.; DELGADO-ANDRADE, C. Melanoidins as a potential functional food ingredient. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 14, p. 37-42, 2017.

MICHAEL, M.; PHEBUS, R. K.; SCHMIDT, K. A. Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in nonfat yogurt. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 20, n. 10, p. 665-672, 2010.

MINOLTA CORPORATION. **Precise color communication: color control from feeling to instrumentation: manual do colorímetro.** Ramsey: Minolta, 1994.

MISRA, N. N.; *et al.* Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. **Food Research International**, Burlington, v. 97, p. 318-339. 2017.

MÖLLER, C.; DE VRESE, M. Review: probiotic effects of selected acid bacteria. **Milchwissenschaft**, Hannover, v. 59, p. 597-601, 2004.

MONENTE, C.; *et al.* Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 12, p. 365-374, 2015.

MORALES, F. J.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V. Physiological Relevance of Dietary Melanoidins. **Amino Acids**, Berlim, v. 42, n. 4, p. 1097-1109, 2012.

MOREIRA, S. R., *et al.* Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras - MG. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 19, p. 147-152, 1999.

MORETTI, B. R. **Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura láctica em iogurtes.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Paulo, 2009.

MORIYA, J.; *et al.* Evaluation of culture media for counts of *Bifidobacterium animalis* in the presence of yoghurt bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 516-520, 2006.

MORO, G. L.; *et al.* Avaliação do pH, atividade de água e cor de quatro marcas comerciais de café torrado e moído. *In*: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS. 6. 2018, São José do Rio Preto. **Anais eletrônicos.** Campinas, Galoá, 2018. Disponível em: <https://proceedings.science/seca/seca-2018/trabalhos/avaliacao-do-ph-atividade-de-agua-e-cor-de-quatro-marcas-comerciais-de-cafe-torra?lang=pt-br>. Acesso em: 12 Mai. 2023.

MORONI, O.; *et al.* Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 6894-6901, 2006.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Texture profile analysis of yogurt as influenced by partially hydrolyzed guar gum and process variables. **Journal of Food Science and Technology**, Mysuru, v. 54, p. 3810-3817, 2017.

MUELLER, U.; *et al.* Identification of H₂O₂ as a major antimicrobial component in coffee. **Food & Function**, London, v. 2, n. 5, p. 265-272, 2011.

MUTTAQIN, Z.; HADI, L.; MAGHFIRAH, Z. Efficacy of Robusta Coffee Bean Extract (*Coffea robusta*) Against Bacterial Growth of *Staphylococcus aureus*. **Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research**, Kota Palembang, v. 6, n. 4, p. 1675-1679, 2022.

NAVEED, M.; *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 97, p. 67-74, 2018.

NISHIYAMA, K.; *et al.* Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 271-279, 2015.

NOGUEIRA, W. V. **Realidades e perspectivas em Ciência dos Alimentos** Nova Xavantina, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/348310105_Realidades_e_Perspectivas_em_Ciencia_dos_Alimentos. Acesso em: 12 mai. 2023.

NONTHAKAEW, A.; *et al.* Caffeine in foods and its antimicrobial activity. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 22, n.1, p. 132-144, 2015.

ODONKOR, S. T.; AMPOFO, J. K. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. **Microbiology Research**, Basel, v. 4, n. 2. p. 5-8, 2013.

OESTREICH-JANZEN, S. Chemistry of Coffee. **Elsevier**, Amsterdam, p. 28, 2013.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 4 , p. 267-276, 2016.

OLIVEIRA, K. A. D. M.; *et al.* Desenvolvimento de formulação de iogurte de araticum e estudo da aceitação sensorial. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 277-281, 2008.

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. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 23, p. 172-176, 2003.

OLIVEIRA, P. D.; *et al.* Avaliação sensorial de iogurte de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) tipo "sundae". **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 380, p. 5-10, 2011.

OLUGBUYIRO, J.; OSEH, J. Physico-chemical and Sensory Evaluation of Market Yoghurt in Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, Dubai, v.10, p. 914-918, 2011.

OPITZ, S. E.; *et al.* Understanding the effects of roasting on antioxidant components of coffee brews by coupling on-line ABTS assay to high performance size exclusion chromatography. **Phytochemical Analysis**, Hoboken, v. 28, n. 2, p. 106-114, 2017.

PARK, Y. W.; *et al.* Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Little Rock, v. 68, n. 1, p. 88-113, 2007.

PASTORIZA, S.; RUFÍAN-HENARES, J. A. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. **Food chemistry**, Dresden, v. 164, p. 438-445, 2014.

- PAULA, J.; FARAH, A. Caffeine Consumption through Coffee: Content in the Beverage, Metabolism, Health Benefits and Risks. **Beverages**, Basel, v. 5, n. 37, p. 1-50, 2019.
- PEI, Z.; *et al.* Identification, characterization, and phylogenetic analysis of eight new inducible prophages in *Lactobacillus*. **Virus Research**, Amsterdam, n. 286, p. 1-9, 2020.
- PENNA, A. L. B.; CONVERTI, A.; DE OLIVEIRA, M. N. Simultaneous effects of total solids content, milk base, heat treatment temperature and sample temperature on the rheological properties of plain stirred yogurt. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 4, p. 515, 2006.
- PEREIRA, P. V.; *et al.* Microbial diversity and chemical characteristics of *Coffea canephora* grown in different environments and processed by dry method. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 37, p. 1-12, 2021.
- PÉREZ-BURILLO, S.; *et al.* Bioactivity of food melanoidins is mediated by gut microbiota. **Food Chemistry**, Dresden, v. 316, p. 126-139, 2020.
- PEROTTO, D. L.; *et al.* Microrganismos causadores de DTAs: um olhar pautado na legislação. **Câmara do Livro**, São Paulo, p. 160, 2021.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, Pomona, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.
- PICARD, C.; *et al.* Artigo de revisão: Bifidobacteria como agentes probióticos: efeitos fisiológicos e clínicos, Benefícios. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Hoboken, v. 22, p. 495-512, 2005.
- PIMENTEL, T. C.; *et al.* Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, Burlington, v. 140, p. 110-133, 2021.
- PLAZA-DIAZ, J.; *et al.* Mechanisms of Action of Probiotics. **Advances in Nutrition**, Oxford, v. 10, n.1, p. 45-52, 2019.
- POMBO, J. C. P.; *et al.* Monitoring of the Fermentation and Shelf-life of Probiotic Yogurt Flavored Pitaya with Cupuassu. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Boa Vista, v. 11, n. 2, p. 129-136, 2021.
- POTHURAJU, R.; *et al.* Influence of milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* NCDC 17 alone and in combination with herbal ingredients on diet induced adiposity and related gene expression in C57BL/6J mice. **Food & Function**, London, v. 6, n. 11, p. 3576-3584, 2015.
- PREEDY, V. R. **Coffee in Health and Disease Prevention**. London: Elsevier, 2015.
- QOSIMAH, D.; *et al.* Green *Coffea robusta* (*Coffea canephora*) from Lampung province effect toward free radicals in chickens infected with *Salmonella enteritidis* bacteria. **Open Veterinary Journal**, Trípoli, v. 11, n. 1, p. 61-69, 2021.
- RAMOS, G. D.; *et al.* Vida de prateleira de iogurte de cajá com *Bacillus clausii*:

avaliação química, físico-química e microbiológica. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 13, n. 4, p. 424-439, 2019.

RANADHEERA, C. S.; *et al.* Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food chemistry**, Dresden, v. 135, n. 3, p. 1411-1418, 2012.

RANTE, H.; *et al.* Antibacterial activity of Robusta coffee (*Coffea robusta* L.) peel extract against human pathogenic bacteria. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, Bareilly, v. 9, p. 264-268, 2021.

RATHI, B.; *et al.* Anti biofilm activity of caffeine against uropathogenic *E. coli* is mediated by curli biogenesis. **Scientific Reports Metrics**, Berlim, v. 12, p. 189-203, 2022.

RAWSON, H. L.; MARSHALL, V. M. Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 32, p. 213-220, 1997.

RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental food microbiology**. 5 ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

REMPE, C. S.; *et al.* The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 422, 2017.

RIBEIRO, B. D.; *et al.* Microbiologia Industrial: Alimentos. **Elsevier**, Amsterdam, v. 1, p. 329-370, 2018.

RIBEIRO, J. F. A.; BOSI, M. G.; DELLA LUCIA, S. M. Análise sensorial de iogurte elaborado com diferentes concentrações de extrato de café. **Brazilian Journal of Food Research**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 26-37, 2017.

RIEDEL, A.; *et al.* N-Methylpyridinium, a degradation product of trigonelline upon coffee roasting, stimulates respiratory activity and promotes glucose utilization in HepG2 cells. **Food & Function**, London, v. 5, n. 3, p. 454-462, 2014.

RINCON, M. A. D. **Fracionamento do óleo de café verde por destilação molecular**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação: Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

ROWLAND, I. Probiotics, and benefits to human health-the evidence in favour. **Environmental Microbiology**, London, v. 1, n. 5, p. 375-376, 1999.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; DE LA CUEVA, S. P. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins- A Study of Their Metal-Chelating Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Granada, v. 57, n. 2, p. 432-438, 2009.

RUIZ, M. P.; *et al.* Suplementacion con *Lactobacillus rhamnosus* GG en la

disminución de los efectos adversos durante la terapia erradicadora del *Helicobacter pylori*. **Revista de Gastroenterología del Perú**, Lima, v. 33, n. 2, p. 121-130, 2013.

SAAD, S. M. I.; *et al.* **Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso**. São Paulo: Varela, 2011.

SACCARO, D. M.; *et al.* Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 5, n. 23, p. 3901-3906, 2011.

SAH, B. N. P.; *et al.* Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. **LWT-Food Science and Technology**, Zurich, n. 65, p. 978-986, 2016.

SALES, A. L.; *et al.* Effects of regular and decaffeinated roasted coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) extracts and bioactive compounds on in vitro probiotic bacterial growth. **Food & Function**, London, v. 11, p. 1410-1424, 2020.

SANDLIE, I.; KLEPPE, K. Mechanism of inhibition of thymidine kinase from *Escherichia coli* by caffeine. **FEBS Letters**, Hoboken, v. 110, n. 2, p. 223-226, 1980.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; *et al.* Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 151-159, 2004.

SANTANA, L. R. R.; *et al.* Perfil sensorial de iogurte *light*, sabor pêssego. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 619-625, 2006.

SANTOS, J.; *et al.* Avaliação dos compostos bioativos e ação antioxidante do iogurte de beterraba com limão. **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 6, n. 5, p. 29301-29311, 2020.

SAVADOGO, A.; *et al.* Bacteriocins and lactic acid bacteria: a minireview. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 5, p. 678-683, 2006.

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**, Utrecht, v. 47, n. 1, p. 79-87, 1999.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHAH, N. P. Functional foods, probiotics and prebiotics. **Food Technology**, Cambridge, v. 55, p. 46-53, 2001.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 83, p. 894-907, 2000.

SHAH, N. P.; JELEN, P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 506-509, 1990.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V. *Bifidobacterium* spp.: Morphology and physiology. **Encyclopedia of Dairy Science**, London, p. 141-146, 2002.

- SHARMA, S.; *et al.* Impact of ultrafine bubbles on the survivability of probiotics in fermented milks. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 140, p. 122-131, 2023.
- SHAZLY, A. B.; *et al.* Probiotic coffee ice cream as an innovative functional dairy food. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, p. 17253, 2022.
- SHORI, A. B.; BABA, A. S. Survival of *Bifidobacterium bifidum* in cow- and camel-milk yoghurts enriched with *Cinnamomum verum* and *Allium sativum*. **Journal of Association Arabic University Basic Applied Science**, Bahrain, v. 18. p. 7-11, 2015.
- SIDHU, P. K.; NEHRA, K. Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. **Journal of King Saud University - Science**, Riyadh, v. 31, n. 4, p. 758-767, 2019.
- SILVA, D. C. G.; ABREU, L. R.; ASSUMPÇÃO, G. M. P. Addition of water-soluble soy extract and probiotic culture, viscosity, water retention capacity and syneresis characteristics of goat milk yogurt. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n.3, p. 545-550, 2012.
- SILVA, F. D.; *et al.* Physical, microbiological and rheological properties of probiotic yogurt supplemented with grape extract. **Journal of Food Science and Technology**, Mysuru, v. 54, p. 1608-1615, 2017.
- SILVA, L. C.; *et al.* Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria-RS. **Disciplinarum Scientia Saúde**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-120, 2012.
- SILVA, L. M.; *et al.* Análise Sensorial de logurte de Café. **Revista de Engenharias da Faculdade Salesiana**, Macaé, v. 14, p. 25-28, 2021.
- SILVA, L. N.; *et al.* Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **American Chemical Society**, Nova Iorque, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, 2016.
- SILVA, S. V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- SINGH, V. P. Recent approaches in food bio-preservation - a review. **Open Veterinary Journal**, Tripoli, v. 8, n. 1, p.104-111, 2018.
- SINGMANN, H.; *et al.* **Analysis of factorial experiments**: R package version 0.13–145, 2023.
- SIRILUN, S.; *et al.* *Lactobacillus* fermented plant juice as a potential ingredient in cosmetics: formulation and evaluation of natural mouthwashes. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Mandsaur, n. 9, p. 52-56, 2016.
- SLYVKA, N. B.; SKULSKA, I. V. Development technology of yogurt with coffee. **Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies**, Lviv, v. 23, n. 96, p. 61-66, 2021.
- SOCCOL, C. R.; *et al.* The potential of probiotics: A review. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

- SONG, J.; *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* 2016SWU.05.0601 regulates immune balance in ovalbumin-sensitized mice by modulating expression of the immune-related transcription factors and gut microbiota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 100, n. 13, p. 4930-4939, 2020.
- SONI, R.; *et al.* Development of probiotic yogurt: Effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. **Journal of Food Science and Technology**, Mysuru, v. 57, p. 2038-2050, 2020.
- SÜLE, J.; *et al.* Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 1023-1030, 2014.
- SUN, C. L.; *et al.* Green tea, black tea and breast cancer risk: A meta-analysis of epidemiological studies. **Carcinogenesis**, Oxford, n. 27, p. 1310-1315, 2006.
- SURYANTI, E.; *et al.* Chemical Composition, Antioxidant, Antibacterial, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of Robusta Coffee Extract (*Coffea canephora*). **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 30, n. 4, p. 632-642, 2023.
- SZAJEWSKA, H.; WANKE, M.; PATRO, B. Meta-analysis: The effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Hoboken, v. 34, n. 9, p. 1079-1087, 2011.
- SZCESNIAK, A. S. Classification of textural characteristics. **Journal Food Science**, Chicago, v. 28, n.1, p. 122-134, 1963.
- SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 215-225, 2002.
- TAMIME, A. Y. **Fermented milks**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008.
- TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Tamime and Robinson's yoghurt: Science and Technology**. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- TAN, G.; KOREL, F. Quality of flavored yogurt containing added coffee and sugar. **Journal of Food Quality**, London, v. 30, n. 3, p. 342-356, 2007.
- TANNOCK, G. W.; *et al.* Analysis of the faecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR 20. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2578-2588, 2000.
- TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, 2023. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 10 de março de 2023.
- TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise Sensorial de Alimentos**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1987.
- THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, Ottawa, v. 87, n. 7, p. 2288-2296, 2003.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia: Anatomia Funcional de células Procarióticas e Eucarióticas**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

TRINDER, M.; *et al.* Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, n. 20, p. 6204-6213, 2016.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 9, p. 225-241, 2014.

TUO, Y.; *et al.* Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 21, p. 22-27, 2013.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Probiotic strawberry yogurts: microbiological, chemical and sensory properties. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, Berlim, v. 10, p. 64-70, 2018.

VARGA, L. **Effect of a cyanobacterial biomass enriched with trace elements on thermophilic dairy starter cultures**. 1999. Dissertation. (PhD). Pannon Agricultural University, Mosonmagyaróvár, 1999.

VARGAS-HERNÁNDEZ, J. G.; RUIZ, I. E. V. Global Trade of Coffee and its Economic Effect in the Value Chain. **Gitam Journal of Management**, Visakhapatnam, p. 18, 2021.

VELEZ-RUIZ, J. F.; HERNANDEZ-CARRANZA, P.; SOSA-MORALES, M. Physicochemical and flow properties of low-fat yogurt fortified with calcium and fiber. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 37, n. 3, p. 210-221, 2013.

VIEIRA, S. S.; *et al.* Patologia de grãos de milho na Companhia Nacional de Abastecimento—CONAB. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE, 3., 2019. Curitiba. **Anais [...]** Curitiba: Conab, 2019. Disponível em: https://www.academia.edu/download/66255638/PATOLOGIA_DE_GRAOS_DE_MILHO_NA_COMPANHIA_NACIONAL_DE_ABASTECIMENTO_CONAB.pdf. Acesso em: 12 abr 2023.

VIGNOLI, J. A.; *et al.* Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of Arabica and Robusta coffees. **Food Research International**, Burlington, v. 61, p. 279-285, 2014.

WALLACE, T.C.; *et al.* Human gut microbiota and its relationship to health and disease. **Nutrition Reviews**, Oxford, v. 69, p. 392-403, 2011.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Concentration processes. Dairy Science and Technology. **CRC Press**, Florida, v. 2, p. 297-335, 2006.

WEICHERT, S.; SCHROTEN, H.; ADAM, R. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Philadelphia, v. 31, p. 859-862, 2012.

WEST, N. P.; *et al.* Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. **Clinical Nutrition**, Amsterdam, v. 33, p. 581-587, 2014.

WESTERIK, N.; *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* probiotic foods as a training tool across the value chain in Africa. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1501-1510, 2018.

WHITNEY, A. K.; WEIR, T. L. Interaction of caffeine with the SOS response pathway in *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, Berlim, v. 7, p. 1-8, 2015.

WU, Y.; *et al.* The effect of chlorogenic acid on *Bacillus subtilis* based on metabolomics, **Molecules**, Basel, v. 25, p. 4038, 2020.

YANAGIMOTO, K.; *et al.* Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Granada, v. 52, n. 3, p. 592-596, 2004.

YANG, S.; YOON, K. Quantitative microbial risk assessment of *Listeria monocytogenes* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Yogurt. **Foods**, Basel, v. 11, p. 971, 2022.

YANGILAR, F.; YILDIZ, P. O. Effects of using combined essential oils on quality parameters of bio-yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 42, n. 1, p. 133-142, 2018.

YASHIN, A.; *et al.* Antioxidant and antiradical activity of coffee. **Antioxidants**, Basel, v. 2, p. 230-245, 2013.

YEAGER, S. E.; *et al.* Acids in coffee: A review of sensory measurements and meta-analysis of chemical composition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 63, n. 8, p. 1010-1036, 2023.

YILMAZ, B.; ACAR-TEK, N.; SÖZLÜ, S. Turkish cultural heritage: a cup of coffee. **Journal of Ethnic Foods**, Berlim, v. 4, n. 4, p. 213-220, 2017.

ZANG, E.; *et al.* Only plant-based food additives: An overview on application, safety, and key challenges in the food industry. **Food Reviews International**, London, p. 1-32, 2022.

ZAVISIC, G.; *et al.* Probiotic features of two oral *Lactobacillus* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 418-428, 2012.

ZEECE, M. **Introduction to the Chemistry of Food**. Cambridge: Academic Press, 2020.

ZHENG, J.; *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: Incorporação de extrato de café com atividade antimicrobiana em iogurte probiótico

Pesquisadora responsável pela pesquisa, com Endereços e Telefones: Eliane Colla. Endereço: Avenida Brasil, 4232, Parque Independência – CEP 85884-000 – Medianeira-PR. Telefones: (45) 3240-8000 e (45) 999176326.

Acadêmico: Marinêz de Souza

Local de realização da pesquisa: UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira.

Endereço, telefone do local: Avenida Brasil, 4232, Parque Independência – CEP 85884-000 – Medianeira – Paraná – Brasil. Telefone: (45) 3240-8000.

A) INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

1. Apresentação da pesquisa.

Os produtos lácteos como os iogurtes probióticos são amplamente consumidos devido ao seu alto valor nutricional. Porém, esses alimentos são passíveis da ação de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de alternativas que visem a redução e/ou eliminação da microbiota indesejável nesses produtos. Nesse sentido, o uso de substâncias de origem vegetal, como é o caso do extrato de café, consiste em uma opção para substituição de antimicrobianos convencionais voltados a essa finalidade, já que apresenta potencial de ação como antimicrobiano. Desta forma, tem-se como objetivo avaliar o efeito de extrato de café canéfora torrado sobre o crescimento de microrganismos patogênicos e bactérias iniciadoras e probióticas em iogurte probiótico, onde busca-se averiguar se o extrato de café possui ação antimicrobiana sobre o crescimento de patógenos sem afetar o desenvolvimento das culturas iniciadoras e probióticas presentes no iogurte. Desta forma, você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa conduzida pela professora Eliane Colla e pela aluna de mestrado Marinêz de Souza do Curso de mestrado em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) do Câmpus Medianeira da UTFPR.

2. Objetivos da pesquisa.

Elaborar diferentes formulações de iogurte com e sem adição de probióticos e extrato de café.

Avaliar a aceitabilidade de iogurte probiótico adicionado de extrato de café.

3. Participação na pesquisa.

Você está sendo convidado (a) para participar da avaliação sensorial de formulações de iogurte, elaboradas utilizando os seguintes ingredientes: leite de vaca, leite em pó desnatado, açúcar cristal, café (5%) e microrganismos probióticos (formulações variando quanto a presença ou não de café e microrganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*). O café apresenta características distintas de sabor, níveis de torra, presença ou ausência de cafeína, entre outros, o que faz com que se destaque como uma das bebidas mundialmente mais consumidas. Dentre os principais benefícios do consumo de café podem ser citados os efeitos contra o câncer, doença cardiovascular, obesidade e diabetes. Além disso, o café também apresenta propriedades antimicrobianas. Porém, a maneira como as substâncias liberadas pelo café atuam sobre os agentes microbianos é pouco conhecida o que justifica a realização de estudos voltados a essa finalidade. Assim, para avaliar a aceitabilidade sensorial de iogurte probiótico com incorporação de extrato de café você receberá 04 diferentes formulações e realizará o Teste de Escala Hedônica de nove pontos, que possui uma escala que vai de gostei muitíssimo (09) até desgostei muitíssimo (01), onde serão avaliados aparência, aroma, cor, sabor, textura e impressão global, mediante preenchimento da Ficha de Avaliação Sensorial. Você também será convidado (a) a preencher um questionário sobre o gênero, escolaridade, idade, renda familiar, frequência e consumo de iogurte e café na mesma ficha. Os testes serão realizados no Laboratório de Análise Sensorial do Campus Medianeira da UTFPR, em cabines individuais com lâmpadas fluorescentes de cor branca. Você será convidado(a) a degustar as 04 amostras de iogurte, observá-las e avaliá-las quanto ao solicitado. Será fornecido cerca de 10g de cada amostra, em copos plásticos descartáveis, de forma aleatória, simultânea e codificada com três dígitos aleatórios, à temperatura de refrigeração, sendo acompanhadas de um copo de água mineral, para que possa enxaguar a boca após a degustação de cada amostra, de forma que não fique gosto residual após a avaliação. O tempo necessário

para a avaliação será de, aproximadamente, 10 minutos e realizada em uma única sessão.

4. Confidencialidade

Todos os dados coletados serão utilizados somente para os fins da pesquisa e serão tratados com sigilo e confidencialidade, de modo a preservar sua identidade, bem como garantida a privacidade de seus conteúdos, como preconiza a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

5. Riscos e Benefícios

5a) Riscos: A presente pesquisa poderá apresentar riscos mínimos de constrangimento ao responder questões sobre os dados pessoais (gênero, idade, escolaridade, renda familiar, frequência e consumo de iogurte e café). Neste caso, buscou-se apresentar questões claras e de múltipla escolha, para reduzir as dificuldades ou desconfortos para o preenchimento. Além disso, os pesquisadores serão os únicos a terem acesso aos dados coletados e manterão o sigilo, ainda que exista uma remota possibilidade de quebra de sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Durante o estudo, as pesquisadoras serão responsáveis pelo armazenamento adequado dos dados coletados e pelo sigilo e confidencialidade das informações dos participantes da pesquisa. Destaca-se ainda que a aplicação da análise sensorial só é permitida e realizada após confirmação dos padrões aceitáveis das análises microbiológicas exigidas para o produto, preservando a segurança alimentar quanto a sua ingestão. Porém, é possível acontecer um desconforto na degustação sensorial das amostras. Em caso de sentir algum tipo de desconforto, você poderá se recusar a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo pessoal, pois a sua participação é totalmente voluntária. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em eventos ou publicações científicas, resguardando o anonimato de todos os participantes.

5b) Benefícios: O(a) senhor(a) não terá benefício direto, a legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela participação em pesquisa; porém, com os resultados obtidos e disseminados através dos meios científicos a indústria e os pesquisadores da área de alimentos poderão utilizar-se

destes na elaboração de produtos que venham atender as expectativas dos consumidores.

A segurança do produto para a análise sensorial será comprovada mediante análise microbiológica, atendendo os padrões microbiológicos estabelecidos pela IN Instrução Normativa nº 161 de 01 de julho de 2022.

6. Critérios de inclusão e exclusão

6a) Inclusão:

Poderão participar da pesquisa indivíduos maiores de 18 anos, independente do gênero, discentes, docentes e técnicos administrativos da UTFPR - Campus Medianeira, consumidores habituais de leite e derivados lácteos, que não sejam alérgicos e/ou intolerantes a qualquer um dos ingredientes das amostras (leite de vaca, leite em pó, açúcar cristal, café, probióticos) e que não possuam problemas de saúde (doenças crônicas, gastrite, úlceras, colesterol e outras) que possam prejudicar a percepção sensorial ou que possam interferir na análise sensorial do produto (gripes e/ou resfriados e/ou rinite alérgica e/ou uso de aparelhos que afetem a percepção sensorial).

6b) Exclusão:

Serão excluídos os participantes da pesquisa que não preencherem a ficha de “Dados Sócio-demográficos e de Consumo” e preencherem as fichas de análise sensorial referente ao “Teste de Aceitabilidade Sensorial – Escala Hedônica”, ou vice-versa, assim como os que deixarem de identificar adequadamente as amostras no preenchimento da ficha sensorial.

7. Direito de sair da pesquisa e a esclarecimentos durante o processo.

Durante todo o período da pesquisa, você terá o direito de esclarecer qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato com o pesquisador. Garante-se também ao participante a plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma pela sua decisão. Se desejar poderá ter acesso ao resultado final da pesquisa, conforme o informado abaixo.

() Sim, desejo receber os resultados da pesquisa (e-mail para envio : _____)

() Não desejo receber os resultados da pesquisa

8. Ressarcimento e indenização.

Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão de responsabilidade dos pesquisadores. Sua participação é isenta de qualquer custo, e, portanto, sem ressarcimento a ser efetuado; no entanto, é de seu direito a indenização prevista pela Resolução 466/12 para danos causados pela pesquisa ao participante.

ESCLARECIMENTOS SOBRE O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:

O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP) é constituído por uma equipe de profissionais com formação multidisciplinar que estão trabalhando para assegurar o respeito aos seus direitos como participante de pesquisa. Ele tem por objetivo avaliar se a pesquisa foi planejada e se será executada de forma ética. Se você considerar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você foi informado ou que você está sendo prejudicado de alguma forma, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Câmpus Medianeira da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR Campus Medianeira). Av. Brasil, 4232, Bloco C - Sala CEP, Bairro Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira-PR, telefone: (45) 3240-8000, e-mail: coep-md@utfprmedu.br

B) CONSENTIMENTO

Eu declaro ter conhecimento das informações contidas neste documento e ter recebido respostas claras às minhas questões a propósito da minha participação direta (ou indireta) na pesquisa e, adicionalmente, declaro ter compreendido o objetivo, a natureza, os riscos e benefícios deste estudo. Após reflexão e um tempo razoável, eu decidi, livre e voluntariamente, participar deste estudo. Estou consciente que posso deixar o projeto a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Nome completo: _____

RG: _____ Data de Nascimento: ___/___/___ Telefone: _____

Endereço: _____

CEP: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível às questões formuladas.

Assinatura pesquisador: _____ Data: ___/___/___

Nome completo: Eliane Colla

Assinatura pesquisador: _____ Data: ___/___/___

Nome completo: Marinêz de Souza

Para todas as questões relativas ao estudo ou para se retirar do mesmo, poderão se comunicar com Eliane Colla, via e-mail: ecolla@utfpr.edu.br ou telefone: (45) 3240-8109.

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa que envolve seres humanos para denúncia, recurso ou reclamações do participante pesquisado:

Comitê de Ética em Pesquisa que envolve seres humanos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR)

Endereço: Av. Brasil, 4232, Bloco C - Sala CEP, Bairro Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira-PR, telefone: (45) 3240-8000, e-mail: coep-md@utfpr.edu.br

OBS: Este documento contém 2 (duas) vias iguais, sendo uma pertencente ao pesquisador e outra ao participante da pesquisa.

APÊNDICE B - Modelo de ficha do teste de escala hedônica

MODELO DE FICHA DO TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: ___/___/___

Você está recebendo 04 (quatro) amostras codificadas de iogurte. Por favor, degustas e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou não do produto.

- | |
|------------------------------|
| (9) Gostei muitíssimo |
| (8) Gostei muito |
| (7) Gostei moderadamente |
| (6) Gostei ligeiramente |
| (5) Não gostei/nem desgostei |
| (4) Desgostei ligeiramente |
| (3) Desgostei moderadamente |
| (2) Desgostei muito |
| (1) Desgostei muitíssimo |

Para isso descreva o quanto você gostou e/ou desgostou, com relação aos atributos (enxague a boca com água mineral entre as amostras).

Amostra número	Aparência	Aroma	Cor	Sabor	Textura	Impressão global

Comentários: _____

APÊNDICE C - Questionário para levantamento de dados

QUESTIONÁRIO PARA LEVANTAMENTO DE DADOS

NOME: _____ DATA: ___/___/___

Telefone: _____ E-mail _____.

Por favor, preencha os dados abaixo (a sua identidade será mantida em sigilo).

Gênero: () Masculino () Feminino

Idade (anos): () 18-25 () 26-35 () 36-45 () 46-55 () Mais de 55

Profissão (ocupação): _____

Grau de instrução:

- () Ensino fundamental incompleto () Ensino médio completo
 () Ensino fundamental completo () Ensino Superior incompleto
 () Ensino médio incompleto () Ensino superior completo ou mais

Renda familiar em salários mínimos:

- () Até 1 salário mínimo.
 () 2 a 5 salários mínimos.
 () 6 a 10 salários mínimos.
 () acima de 11 salários mínimos.

1. Você possui o hábito de consumir café?

- () Sim () Não.

1.1 Se sim, com que frequência você consome?

- () Diariamente () 1 vez por semana () 2 vezes por mês
 () Ocasionalmente () Nunca.

2. Você possui o hábito de consumir iogurte?

- () Sim () Não.

2.1 Se sim, com que frequência você consome?

- () Diariamente () 1 vez por semana () 2 vezes por mês
 () Ocasionalmente () Nunca.

3. Qual é o tipo de iogurte que você mais consome?

- () iogurte natural integral () iogurte natural desnatado () iogurte grego
 () iogurte zero lactose () iogurte zero açúcar () Outros _____

4. Você possui o hábito de consumir iogurte probiótico?

- () Sim () Não.

4.1 Se sim, com que frequência você consome?

- () Diariamente () 3 vezes por semana () 1 vez por mês
 () Ocasionalmente () Nunca.

5. Você busca alimentos mais saudáveis?

- () Sim () Não.

6. O que você avalia na compra de um iogurte?

- () Preço () Prazo de validade
 () Marca () Qualidade Nutricional
 () Aparência () Outros _____

7) Você consome alimentos probióticos?

- () Sim () Não.

7.1 Se sim, qual (is) você consome? _____

7.2 Se sim, com que frequência você consome?

- () Diariamente () 1 vez por semana () 2 vezes por mês
 () Ocasionalmente () Nunca.

8) Você consome algum alimento com adição ou sabor de café?

- () Sim () Não.

8.1 Se sim, com que frequência você consome?

- () Diariamente () 1 vez por semana () 2 vezes por mês
 () Ocasionalmente () Nunca.