



UNICEPLAC

Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC

Curso de Medicina Veterinária

Trabalho de Conclusão de Curso

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE PROBIÓTICOS
DE LEITE FERMENTADO EM DIFERENTES TEMPOS DE
ARMAZENAMENTO**

Gama-DF

2019

DÉBORAH LUCENA PACHECO

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE PROBIÓTICOS
DE LEITE FERMENTADO EM DIFERENTES TEMPOS DE
ARMAZENAMENTO**

Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Stefania Marcia de Oliveira Souza.

Gama-DF

2019

DÉBORAH LUCENA PACHECO

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE PROBIÓTICOS DE LEITE
FERMENTADO EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO**

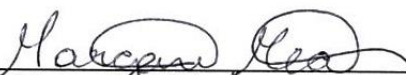
Artigo apresentado como requisito para
conclusão do curso de Bacharelado em
Medicina Veterinária pelo Centro
Universitário do Planalto Central Aparecido
dos Santos – Uniceplac.

Gama, 31 de novembro de 2019,

Banca Examinadora



Prof. Stefania Marcia de Oliveira de Souza.
Orientador



Prof. Margareti Medeiros
Examinador



Prof. Manuella Rodrigues de Souza Mello
Examinador

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE PROBIÓTICOS DE LEITE FERMENTADO EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO

Déborah Lucena Pacheco¹ Stefania Marcia de Oliveira Souza²

Resumo:

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em leites fermentados de duas marcas distintas e armazenados em diferentes períodos sob refrigeração. Os resultados de ambos foram satisfatórios para a maioria dos períodos avaliados, de acordo com o encontrado nas legislações, que relata que no mínimo deve apresentar 10×10^6 UFC/g. Porém no dia D5 (4×10^3) o leite fermentado desnatado adoçado da marca “A” e nos dias D10 ($6,5 \times 10^4$) e D30 ($1,15 \times 10^4$) do leite fermentado desnatado adoçado da marca “B” não apresentaram o crescimento de um dos microrganismos avaliados, assim apresentando valores insatisfatórios abaixo do recomendado, sendo que no dia D30 o produto já havia ultrapassado o seu prazo de validade. Colônias fúngicas surgiram no ágar M17 nos dias 0, 5, 15, 20, 25 e 30 de armazenagem e estavam associados à diminuição de *Streptococcus thermophilus* podendo assim estar relacionado à disputa por nutrientes. As análises de leite fermentado desnatado adoçado da marca “A” e “B” demonstraram desenvolvimento favorável de ambos os microrganismos avaliados durante seu prazo de validade e pós-validade do produto.

Palavras-chave: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* . *Streptococcus thermophilus*. Bactérias ácido lácticas. Microrganismos.

Abstract: This study aimed to evaluate the development of lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in fermented milk of two distinct brands and stored in different cooling periods. Both results were satisfactory for most of the considered periods, as found in a minimum of 10×10^6 CFU/g. However on day D5 (4×10^3) the sweetened fermented skim milk from brand “A” and on days D10 (6.5×10^4) and D30 (1.15×10^4) of the sweetened fermented skim milk from brand “B” did not show growth of one of the microorganisms observed revealing unsatisfactory values below the recommended, and on D30 the product had already passed its expiration date. Fungal colonies appeared on agar M17 on days 0, 5, 15, 20, 25 and 30 of storage and were associated with the reduction of *Streptococcus thermophilus* which may be associated with nutrient dispute. To conclude, the analyzes of sweetened fermented skim milk from brands “A” and “B” showed favorable to the development of both microorganisms observed during the product’s shelf life and post-shelf life.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Streptococcus thermophilus*. Lactic acid bacterias. Microorganisms.

¹Graduanda do Curso Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. E-mail: deborah.lucenap@gmail.com.

²Professora Dr^a em Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. E-mail: stefsouza77@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos a produção de laticínios no Brasil vem crescendo e ocupa a segunda maior categoria de faturamento no país, ficando atrás somente da produção de carne, com total de R\$ 70,2 bilhões movimentados em 2017 (ABIA, 2017).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) – Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. Sua qualidade é avaliada através de testes físico-químicos, microbiológicos e higiênicos sanitários para se avaliar a qualidade do leite (BRASIL, 2017).

O leite é um alimento rico em nutrientes sendo que seus principais componentes são vitaminas, proteínas, carboidratos e sais minerais, sendo um excelente meio de cultivo para desenvolvimento de microrganismos tanto benéficos quanto patogênicos e deteriorantes (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Um dos importantes fatores que comprometem a qualidade do leite é a presença de doenças no rebanho, ausência de higiene durante a ordenha e sanitização nos equipamentos utilizados, condições de armazenamento e transporte inadequados (SOARES E GAGLIETTI, 2015).

As bactérias que contaminam o leite podem ser classificadas em três grupos: mesófilas, que se multiplicam em temperaturas de 20° a 40°C; termofílicas, sobrevivem à pasteurização (30 minutos a 63°C ou 15 segundos a 72°C); e psicrófilas, que gostam e se multiplicam em temperaturas baixas, de 7°C ou menos (PAIVA *et al.*, 2010).

De acordo com o Decreto 9.013 Art. 255 devido a possível presença destes microrganismos é exigido por lei que o leite seja pasteurizado. Inclusive, após o processo de pasteurização as enzimas produzidas por microrganismos estarão presentes nos produtos lácteos, fazendo a degradação dos nutrientes no leite (MADALENA, *et al.* 2001; BRASIL, 2017).

Os microrganismos de maior importância são aqueles que contaminam o leite durante e após a ordenha. A temperatura e o tempo de armazenamento do leite estão diretamente relacionados à multiplicação de microrganismos do leite. Assim, o leite quando obtido de ordenha mecânica e sendo refrigerado a 4°C, possui característica microbiológica de melhor qualidade. O processo de redução da temperatura impossibilita ou reduz o crescimento de bactérias e diminui a ação de enzimas degradativas (MENEZES *et al.*, 2015).

Apesar da presença de microrganismo que podem causar danos a saúde do consumidor e/ou deteriorar o leite, existem outros microrganismos no leite que são benéficos conhecidos como bactérias ácido lácticas (BAL's). Um exemplo são os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*, que por sua ação, colaboram para a definição das características do produto final (MENEZES *et al.*, 2015).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são Gram-positivos, catalase negativa, não esporulados, fazem fermentação láctea, deterioram açúcares, resultando como principal produto, ácido láctico. Apresentam faixa de temperatura ótima de 35 a 40 °C, cresce em pH na faixa de 5,5 a 6,0 e são capazes de superar ambientes ácidos entre 0,3% a 1,9% de acidez titulável (GOKTEPE *et al.*, 2006). *Streptococcus thermophilus* é uma bactéria, que não forma esporos, Gram-positivo, catalase negativa, termofílico, com crescimento entre 37° e 42°C e não se desenvolve bem em temperaturas baixas, além de serem resistentes à pasteurização (DUWAT *et al.*, 2001; ORDÓÑEZ-PEREIRA *et al.*, 2005).

Segundo Parvez *et al.* (2006) o método de seleção de uma bactéria ácida láctica para ser utilizada como probióticas engloba as seguintes características, ter efeito benéfico no hospedeiro, continuar viável durante a validade do produto, aglutinar às células do intestino e habitar o lúmen do trato gastro intestinal, apresentar substâncias antimicrobianas aos patógenos e equilibrar a microbiota intestinal. Alguns exemplos de microrganismos que produzem ácido láctico e são probióticos são *Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *Enterococcus faecium SF68* e *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* e espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Os mais utilizados são *Lactobacillus* e *Streptococcus* (MARTINS *et al.* 2010).

Os probióticos são microrganismos vivos, que se consumidos de forma adequada são capazes de trazer benefícios à saúde do consumidor, podendo prevenir doenças principalmente gastrointestinais e ainda aumentar a imunidade (RAIZEL *et al.*, 2011). Dentre os benefícios destacam-se o monitoramento de infecções intestinais, no estímulo de motilidade intestinal, no aumentando da absorção de nutrientes, reduz níveis de colesterol, diminuindo o efeito carcinogênico e estimula o sistema imune (FRANCO E LANDGRAF, 2005; DUARTE *et al.*, 2016).

Alimentos funcionais são caracterizados em oferecer benefícios à saúde dos consumidores, despertando o interesse de indústrias alimentícias a produzir alimentos atraentes e benéficos ao mesmo tempo. Os derivados lácteos estão em avanço na produtividade dos alimentos funcionais, alguns sendo feitos acrescentando bactérias ácidas lácticas (BAL's) definidas como bactérias probióticas (BRUNARI E SALOTTI-SOUZA, 2017). Neste caso, a produção de uma bebida láctea fermentada com meios probióticos, vira uma escolha atraente para as fábricas de laticínios, assim como possíveis consumidores, que procuram alimentos mais saudáveis, nutritivos e saborosos (THAMER E PENNA, 2005).

Conforme o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), leites fermentados são produtos lácteos ou produtos lácteos compostos por meio da coagulação e da diminuição do pH do leite ou do leite reconstituído por meio da fermentação láctea, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, com adição ou não de produtos lácteos ou de substâncias alimentícias (BRASIL, 2017). Segundo a instrução normativa (IN) SDA nº4 de 2013 atualizada em 2019, à contagem total de bactérias ácido lácteas viáveis deve ser igual ou superior a 10^6 unidades formadoras de colônias/grama (UFC/g), os microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2019). São considerados leites fermentados o iogurte, o leite fermentado ou cultivado, o leite acidófilo ou acidofilado, o kumys, o kefir e a coalhada (BRASIL, 2017).

Sendo assim, objetivou-se avaliar o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em leites fermentados armazenados em diferentes períodos sob refrigeração.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

Foram adquiridas em um estabelecimento comercial 12 amostras de leites fermentados de duas marcas diferentes, sendo 6 da marca A e 6 da marca B. Tanto as amostras da marca A quanto da marca B pertenciam ao mesmo lote e estavam dentro do prazo de validade. Após aquisição foram imediatamente acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e então transportadas no mesmo dia ao laboratório de microbiologia da UNICEPLAC.

No laboratório, as amostras foram então alíquotadas em volumes de 5 mL e transferidas para recipientes de vidro previamente esterilizados e então acondicionadas sob refrigeração a 7°C. As alíquotas foram então avaliadas em diferentes tempos sendo estes D0 (dia da aquisição da amostra), D5, D10, D15, D20, D25 e D30 de estocagem sob refrigeração.

2.2 – ANÁLISE DOS MICRORGANISMOS *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS* E *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

As análises foram realizadas conforme descrito por Nero *et al.* (2006) e Ortolani *et al.* (2007), com alterações. Foram realizadas diluições decimais do leite fermentado desnatado adoçado da marca A e da marca B, em solução salina 0,85% até a diluição de 10^{-5} . A partir da diluição (10^{-5}), foi inoculado 0,1 mL em meio de ágar Mann-Rogosa-Sharpe MRS (KASVI®) para o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e em ágar M17 (SIGMA-ALDRICH®) para crescimento de *Streptococcus thermophilus* em duplicata, sendo então acondicionadas em jarras de anaerobiose e incubadas a 35°C por 48 horas. Este protocolo foi repetido nos dias, D5, D10, D15, D20, D25 e D30. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias/g (UFC/g). Para caracterizar os microrganismos como BAL's foi realizada coloração de Gram e catalase (Gram positivos e Catalase negativos), sendo o processo realizado em cada um dos tempos avaliados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* de leite fermentado desnatado adoçado nos diferentes tempos de análise estão representados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados dos valores obtidos na contagem de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em leites fermentados adoçado.

* Valor mínimo de contagens de bactérias ácido lácticas totais em leites fermentados 10^6 (BRASIL, 2019).

DIA	MARCA (A)			MARCA (B)		
	UFC/mL*			UFC/mL*		
	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	BAL's totais	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	BAL's totais
0	4,56x10 ⁵	3,52x10 ⁵	8,08x10 ¹⁰	7,45x10 ⁴	1,28x10 ⁵	8,73x10 ⁹
5	-----	4,0x10 ³	4,00x10 ³	1,49x10 ⁵	2,44x10 ⁵	3,93x10 ¹⁰
10	3,62x10 ⁵	3,83x10 ⁵	7,45x10 ¹⁰	-----	6,50x10 ⁴	6,50x10 ⁴
15	2,58x10 ⁵	1,59x10 ⁴	4,17x10 ⁹	4,10x10 ⁴	9,80x10 ⁴	1,39x10 ⁹
20	2,10x10 ⁴	2,20x10 ⁴	4,30x10 ⁸	4,60x10 ⁴	3,05x10 ⁴	7,65x10 ⁸
25	1,30x10 ⁵	2,89x10 ⁵	4,19x10 ¹⁰	1,36x10 ⁵	1,00x10 ³	2,36x10 ⁸
30	3,05x10 ⁵	3,58x10 ⁵	6,63x10 ¹⁰	1,15x10 ⁴	-----	1,15x10 ⁴

O resultado de ambos foram satisfatórios, de acordo com o exigido na legislação, que no mínimo deve apresentar 10^6 UFC/g. Porém no dia D5 (4×10^3) o leite fermentado desnatado adoçado da marca “A” com a data de fabricação: 18/04/19 e com validade: 19/05/19 e no leite fermentado desnatado adoçado da marca “B” com data de fabricação: 28/03/19 e de validade: 07/05/19 nos dias D10 ($6,5 \times 10^4$) e D30 ($1,15 \times 10^4$), não houveram crescimento de um dos microrganismos avaliados, assim apresentando valores insatisfatórios abaixo do recomendado sendo que no D15 o produto “B” e D30 do produto “A” já haviam passado do seu prazo de validade.

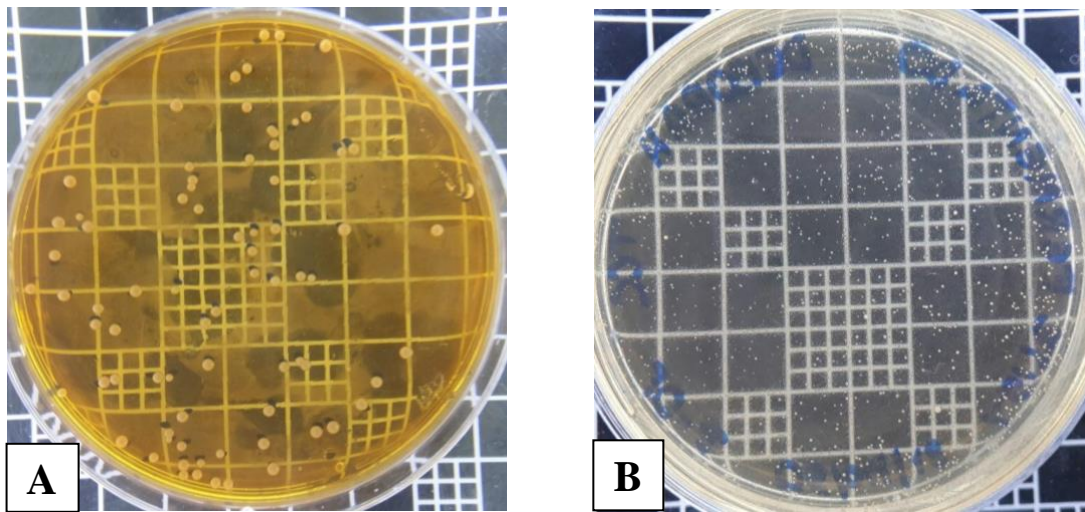
O crescimento de bactérias ácido lácticas do leite fermentado desnatado adoçado da marca “A” apresentou valores superiores ao estabelecido pela legislação. Ao passar do tempo de armazenamento os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* apresentaram desenvolvimento na maioria dos períodos avaliados, com exceção do dia D5 (4×10^3) onde não se observou crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* em meio Ágar MRS. Após o dia D30, onde o produto “A” já estava fora do prazo de validade, permaneceu com o crescimento dos microrganismos e apresentando valores bem maiores que o exigido.

O mesmo foi observado na marca B onde também houve valores em conformidade com a legislação para a maioria dos períodos avaliados com exceção dos dias D10 ($6,5 \times 10^4$), onde não houve crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, e D30 ($1,15 \times 10^4$) de *Streptococcus thermophilus* apresentando resultados abaixo do estabelecido. No dia D15 o produto já tinha ultrapassado do seu prazo de validade.

Observou-se desenvolvimento de colônias fúngicas no meio Ágar M17, em ambas as marcas dos produtos nos dias D0, D5, D15, D20, D25, D30. Nesses períodos, verificou-se a associação ao desenvolvimento dos fungos a uma diminuição das colônias de *Streptococcus thermophilus* sugerindo uma disputa pelos nutrientes dos meios em que o produto foi inoculado.

A figura 1 mostra o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* do leite fermentado desnatado adoçado, as colônias de BAL's que são caracterizadas por colônias de coloração esbranquiçada, consistência cremosa, de tamanho pequeno e forma arredondada ou oval.

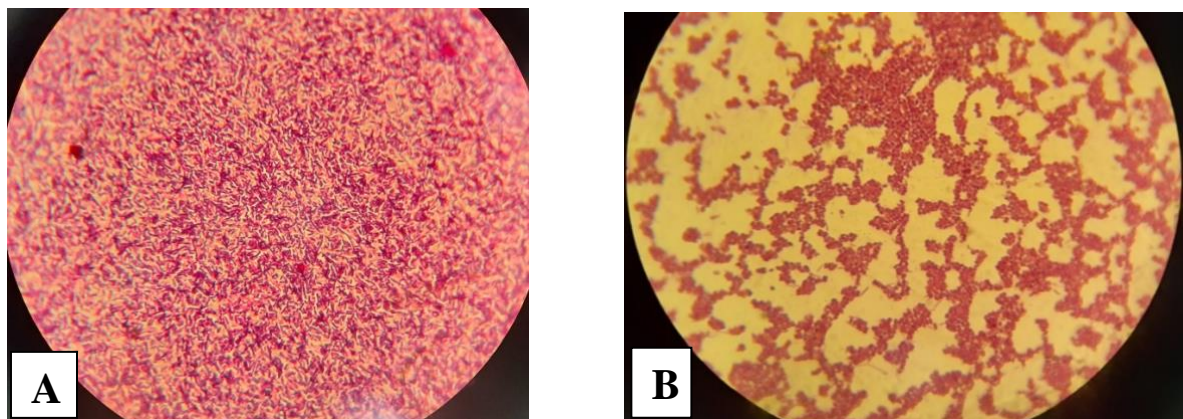
Figura 1. (A) Colônias de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e (B) Colônias de *Streptococcus thermophilus* no leite fermentado desnatado adoçado marca “A”.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Foram realizados testes de coloração de Gram e teste de Catalase para comprovação de bactérias ácidas lácticas BAL's onde os dois são gram positivo e catalase negativo podendo apresentar morfologia em cocos ou bacilos. Assim identificando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* na devida ordem. (FIGURA 2).

Figura 2. (A) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B) *Streptococcus thermophilus*.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Diante dos resultados, observa-se que os produtos avaliados ainda apresentaram características microbiológicas em acordo com a exigência legal, assim demonstrando características para o consumo humano. Considerando que grande parte das bactérias ácido lácticas são mesofílicas, ou seja, se multiplicam em temperaturas de 20° a 40°C, a maioria das amostras independentemente do período e a forma de refrigeração apresentaram valores bem maiores ao estabelecido.

As bactérias lácticas são sensíveis a diminuição do pH, apresentando assim menor viabilidade. O potencial hidrogeniônico (pH) é fator a ser considerado para os resultados de deterioração do alimento, para o crescimento de microrganismos, a ação das enzimas, conservação de sabor e odor. Em estudo realizado por Almeida *et al.*, (2001), onde foi produzido uma bebida láctea com valores de pH entre 5,07 e 5,14 os autores observaram que algumas bifidobactéria não se desenvolvem com o pH entre 4,5 e 5,0 (ALMEIDA *et al.*, 2001),

Assim como apresentado por Almeida *et al.*, (2001) o processo fermentativo prolongado é explicado pelo lento crescimento do *Lactobacillus spp.* que exige alta quantidade de nutrientes. No decorrer do armazenamento dos leites fermentados acontece um crescimento de bactérias lácticas presentes no produto, em sua maioria mesofílicas. Durante o crescimento das bactérias lácticas, podem ser produzidos compostos que possuem ação antimicrobiana, como bacteriocinas, ácidos, peróxido de hidrogênio, gás carbônico, álcool e aldeído (BALLARDIN *et al.*, 2014). Estes compostos podem impossibilitar o crescimento de outros microrganismos, podendo assim diminuir as contagens de BAL's realizadas no presente estudo.

O *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* apresentam uma ligação denominada protocooperação durante a confecção da bebida, não existindo nenhuma dependência um do outro para sobreviver. Essas bactérias tornam o meio mais ácido quando são inoculadas como cultura mista ao invés de ser utilizado como culturas isoladas (THAMER E PENNA 2005).

No estudo realizado por Thamer e Penna (2005) demonstraram que no decorrer da fermentação, o *Streptococcus thermophilus* cresceu aceleradamente, usando os aminoácidos essenciais feitos pelo *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. O *Streptococcus thermophilus* produz ácido láctico e fórmico diminuindo o pH do meio proporcionando um excelente crescimento do *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. O ácido láctico e fórmico produzido em pequenas proporções estimulam o crescimento do *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Assim, o crescimento acelerado das bactérias lácticas do leite

fermentado é justificado pela provável queda do pH durante o período de armazenamento.

As bifidobactérias precisam de condições anaeróbias para o seu desenvolvimento, assim as bebidas lácteas que sejam estocadas em copos de polietileno podem não fornecer o ambiente adequado para o desenvolvimento. O uso de embalagens de vidro em vez das de polietileno e poliestireno é mais aconselhável (THAMER E PENNA 2005). De acordo com o apresentado por Thamer e Penna (2005), que embalagens de vidro são mais aconselhadas para o armazenamento de bebidas lácteas, as amostras foram transferidas para recipientes de vidro previamente esterilizados podendo assim mostrar uma maior eficiência no desenvolvimento de bifidobactérias.

De acordo com Coelho *et al.*, (2009), uma contagem alta de microrganismos em produtos lácteos provavelmente ocorre pelo acúmulo de ácido láctico que por sua vez vai inibir o crescimento de outras bactérias ácido lácticas e com a queda do pH, promove o desenvolvimento de bolores e leveduras. Esta interrelação pode estar relacionada com a falha de higienização de embalagens e equipamentos, sendo possível ter contaminação na adição de componentes ao produto tais como açúcar e polpa de frutas, visto que são propensos ao crescimento de leveduras. Sendo assim, a adição de açúcar no leite fermentado também pode favorecer o crescimento de bolores e leveduras no meio.

Segundo Kennes *et al.*, (1991), bactérias ácido lácticas transformam continuamente os açúcares e ácidos orgânicos presentes, por exemplo, a glicose e o citrato. Esta transformação faz com que a gradação da glicose seja na faixa de 3,0 a 5,0 do pH. O citrato tem a capacidade de beneficiar o crescimento de bactérias ácido láctico devido à disponibilidade de mais ATP, também podendo fazer um papel na atividade microbiana. Assim justifica-se que o leite fermentado desnatado adoçado pode apresentar um maior crescimento de BAL's em razão de ter a adição de açúcar na sua composição.

De acordo com Ballardin *et al.*, (2014), quando ambos os microrganismos ficam em temperaturas de refrigeração exigidas pela legislação brasileira para o acondicionamento do leite, pode acontecer uma perda da qualidade da matéria-prima devendo ser feita uma análise para se evitar uma contaminação inicial. A contaminação do produto, por microrganismos indesejados, é capaz de alterar sua composição e interferir no crescimento das bactérias ligadas à produção de derivados lácteos, já que poderá existir competição pelos nutrientes e com isso provoca mudanças nas características do produto final. A diminuição gradativa dos microrganismos no presente estudo pode estar relacionada tanto a contaminação inicial da matéria prima como na contaminação do produto final já que os microrganismos entram em competição pelos nutrientes presentes no alimento.

Foi possível verificar que nas análises do leite fermentado de ambas as marcas, um crescimento de leveduras. Leveduras são microrganismos existentes em algumas categorias de leites fermentados como, por exemplo, o kefir. Os bolores podem estar implicados na deterioração de derivados lácteos e assim podem gerar alterações na qualidade do leite. Pode existir uma ligação entre crescimento de bactérias mesófilas aeróbias e de bolores e leveduras sendo capaz de ter um crescimento no tempo inicial. Na pesquisa de KENNES *et al.*, 1991, quando ocorria o aumento de aeróbios mesófilas ocorria diminuição na presença de bolores e leveduras. Assim, os resultados da presente pesquisa apresentam semelhança onde à presença de colônias fúngicas relacionou-se a diminuição de *Streptococcus thermophilus*.

A disponibilidade de nutrientes ao longo da validade do produto vai definir o desenvolvimento de microrganismo além dos valores de pH e a existência de substâncias antimicrobianas produzidas por BAL's (GOBBETTI *et al.*, 1994). Tais fatores também podem ter influenciado o desenvolvimento das bactérias avaliadas na presente pesquisa.

Quando dois microrganismos crescem juntos em um meio definido, no qual o crescimento da levedura é limitado pelas concentrações de vitaminas, que é indispensável para o crescimento de *Lactobacillus spp.* seu desenvolvimento será reduzido no meio pela célula de levedura (GOBBETTI *et al.*, 1994). Verificou-se neste trabalho que leveduras são organismos presentes e que estes viabilizam o desenvolvimento de BAL'S do gênero *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e influenciam no baixo desenvolvimento do gênero *Streptococcus thermophilus*, devido à provável competição entre os microrganismos.

Destaca-se que as leveduras e bactérias ácido lácticas podem se desenvolver no mesmo meio podendo disputar nutrientes. Assim, dependendo de qual for o ambiente onde os microrganismos estão compartilhando, através da seleção natural, alguns microrganismos terão maior chances de sobreviver desempenhando uma pressão seletiva o que possibilita alterações estáveis na sua formação química e microbiológica (KENNES *et al.*, 1991).

A presente pesquisa demonstrou instabilidade no crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, onde no dia 5 e no dia 10 não foi observado desenvolvimento da bactéria provavelmente mantendo-se em latência. Já em relação às leveduras foi observado uma possível adaptação ao meio. Mediante a isto sugere-se que devido às relações opostas existentes no meio, as colônias fúngicas mantiveram-se no meio em alguns momentos do armazenamento, mantendo-se o desenvolvimento de *Streptococcus thermophilus* possivelmente pela maior adaptação a acidez provocada pela presença dos fungos e compostos do leite fermentado.

CONCLUSÃO

As análises de leite fermentado desnatado mostraram rendimentos favoráveis durante seu prazo de validade e pós-validade do produto. Ainda foi observado presença de leveduras, que competiam pelos nutrientes do produto.

Portanto observou-se que durante o processo de armazenamento do leite fermentado, ocorreram convivências antagônicas entre os microrganismos o que interfere no crescimento das bactérias ácido lácticas além de uma possível variações no pH do produto.

REFERÊNCIAS

- ABIA. Números do Setor – Faturamento. **Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação**, 2017.
- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Cien. Tec. Al.**, v. 2, n. 2, p. 187-192, 2001.
- BALLARDIN, A. C.; FAGUNDES D. I. *et al.* **Análise de microrganismos presentes em amostras de leite fermentado durante a vida de prateleira do produto.** Faculdade da serra gaúcha. II Congresso de Pesquisa e Extensão da FSG. 12p. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).** Da classificação dos derivados lácteos, Seção II, Subseção IV. Brasília, 2017.
- BRASIL. Instrução Normativa (IN) SDA nº4 de 28 de fevereiro de 2019. **Programa de Avaliação de Conformidade de Padrões Físico-químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Comestíveis e Água de Abastecimento.** Brasília, 2019.
- BRUNARI, N. C.; SALOTTI-SOUZA B. M. Bactérias Probióticas e sua Aplicação em Leites Fermentados. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v.1, n.1, p. 22-29, 2017.
- COELHO, F. J. O.; QUEVEDO, P. S.; MENIN, A. *et al.* Avaliação do prazo de validade do iogurte. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1155-1160, 2009.
- DUARTE, M.C.K.H.; CORTEZ, N.M.S.; CORTEZ, M.A.S. *et al.* Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.3, n.1, p.110, 2016. Disponível em: <<http://periódicos.ifap.edu.br/indix.php/JBFS>> Acesso em : 04 abr. 2018.
- DUWAT, P.; SOURICE, S.; CESSÉLIN, B. *et al.* Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival. **Journal of bacteriology**. v. 183, n. 15, p. 4509-4516, 2001
- FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. **Atheneu**, 182p. 2005.
- GOBBETTI, M.; CORSETT, A.; ROSSI, J. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Vol 10, 1994.
- GOKTEPE, I. Probiotics as Biopreservatives for Enhancing Food Safety. **Probiotics in Food Safety and Human Health**. p.285-307, 2006.
- KENNES, C.; VEIGA, M.C.; DUBOURGUIER, H.C.; TOUZEL, J.P; ALBAGNAC, G.; NAVEAU, H. NYNS, E.J. Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. *Applied and Environmental Microbiology*, **Baltimore**, v. 54, n.4, p.1046-1051, 1991

MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JUNIOR, E. V. Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil. **FEPMVZ editora**, p.75-83. 2001. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=134562&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22MATOS,%20L.L.de%22&qFacets=autoria:%22MATOS,%20L.L.de%22&sort=&paginaAtual=4>> Acesso em: 25 junh. 2018.

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R.M. *et al.* Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. **Journal 5 PLoS One**, v. 5, n. 1, 2010.

MENEZES, I. R.; ALMEIDA A.C.; MORÃO, R.P.; *et al.* **Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais**, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2015.

NERO, L.A.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; *et al.* Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and the ManRugosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 14, p 249-257, 2006.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. *et al.* **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 5587, 2005.

ORTOLANI, M.B.T.; VIÇOSA, G.N.; BELOTI, V.; *et al.* Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology, **Journal of Dairy Research**, v.41, p. 387-391, 2007.

PAIVA E. B.; BRITO. A.V.; LANGE, C.C. **A qualidade do leite**. p.1 2010. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.html> Acesso em: 25 junh. 2018.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S. Ah.; KIM, H. Y. **Probiotics and their fermented food products are beneficial for health**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; *et al.* Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RODRIGUES, L. G.; CARLI, E. ; OLIVEIRA, A. D; *et al.* Bacia Leiteira do Extremo Oeste de Santa Catarina: Estudo do Rebanho, Manejo e Gestão visando a Qualidade do Leite em Unidades Produtoras. **Revista CSBEA**, v. 1, n. 1. 2015. Disponível em: <<http://periodicos.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/6768/6573>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

SOARES, V.; GAGLIETTI, M. J. Rastreabilidade da cadeia leiteira como requisito de qualidade. **Tecnológica**, v. 3, n. 2 p. 259-267, 2015.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** vol. 41, 2005.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por iluminar meu caminho até aqui para conseguir seguir firme.

Ao meu esposo Fernando por todo apoio e incentivo, dedicação e palavras de carinho nas horas mais difíceis, obrigada por me proporcionar este meu sonho graças à sua ajuda.

A minha orientadora, Prof^ª Stefania Marcia de Oliveira Souza, por todo conhecimento repassado a mim e pela paciência e dedicação na minha orientação acadêmica.

Aos meus amigos Raylana, Luanda, Camila e Junior por todas palavras de amizade pelos atos de demonstração de carinho por mim durante toda a minha caminhada do curso. Terei eterna gratidão por vocês.

A Wendy, responsável pelo laboratório por toda ajuda e aprendizado durante o tempo que convive no laboratório, sempre disposta a ajudar com todo carinho e paciência.

E obrigada a todos os mestres da UNICEPLAC, por contribuírem com minha formação acadêmica.