



UNICEPLAC

Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC

Curso de Medicina Veterinária

Trabalho de Conclusão de Curso

Desenvolvimento e viabilidade de bactérias ácido lácticas na bebida láctea fermentada em diferentes tempos

Gama-DF

2019



UNICEPLAC

MARISA PONTES DA SILVA PERES

**Desenvolvimento e viabilidade de bactérias ácido lácticas na
bebida láctea fermentada em diferentes tempos**

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



UNICEPLAC

MARISA PONTES DA SILVA PERES

Desenvolvimento e viabilidade de bactérias ácido lácticas na bebida láctea fermentada em diferentes tempos

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 outubro de 2019.

Banca Examinadora

Orientadora: Dra. Stefania Marcia O. Souza

Examinadora: Dra. Margareti Medeiros

Examinadora: Me. Manuella Rodrigues S. Mello



UNICEPLAC

Desenvolvimento e viabilidade de bactérias ácido lácticas na bebida láctea fermentada em diferentes tempos

Marisa Pontes da Silva Peres¹

Resumo:

As bebidas lácteas fermentadas são derivados láctios, fonte de cálcio e proteínas, de baixo custo de produção e baixo preço final para o consumidor, por poderem conduzir probióticos e serem reconhecidas como produtos saudáveis. A pesquisa em questão teve como objetivo verificar o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas (BAL'S), *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* na bebida láctea fermentada, avaliando a influência do tempo de refrigeração na viabilidade destes microrganismos. O derivado lácteo foi avaliado durante 40 dias a partir do nono dia de fabricação (D0, D5, D10, D15, D20, D30, D40), incluindo um período após prazo de validade, em duas amostras de bebida láctea fermentada. Os resultados obtidos no D0 para ambas amostras, D5 para amostra de côco, e D5 e D40 para amostra de salada de frutas, não se apresentaram condizentes com o valor predisposto pela legislação vigente, além da ausência de *Streptococcus thermophilus* e do aparecimento de hifas fúngicas em todo período de análise. Contudo, conclui-se que as amostras apresentaram resultados favoráveis ao padrão legal, na maior parte do tempo analisado.

Palavras-chave: BALs. *Lactobacillus bulgaricus*. *Streptococcus thermophilus*. Derivados Lácteos.

Abstract:

The fermented dairy drinks are sources of calcium and protein that are a low cost and also present a low final price to the consumer, for they can drive probiotics, in order to be recognized as healthy products. The present study had as its main goal verifying the development of the lactic acid bacteria (BAL'S), *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the fermented milk drink, evaluating the influence of the cooling time on the viability of these microorganisms. The dairy derivative was evaluated for 40 days (D0, D5, D10, D15, D20, D30, D40), including the period after its expiration date, in two samples of fermented dairy drink. The results one have had on the D0 to both samples, D5 to the coconut sample and D5 as well as D40 to the fruit salad one, have not presented consistent results in accordance with the value predisposed by the current legislation, besides the absence of *Streptococcus thermophilus* and the appearance of fungal hyphae throughout the analysis period. However, it can be concluded that the samples presented results favorable to the legal standard, in most of the analyzed time.

Keywords: LAB. *Lactobacillus bulgaricus*. *Streptococcus thermophilus*. Dairy derivatives.

¹Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac, Gama - DF. E-mail: marisapontes96@gmail.com.



UNICEPLAC

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma substância constituída por água, e outros componentes orgânicos como proteínas, gordura, lactose, vitaminas e minerais, tornando-o fonte de nutrientes para o desenvolvimento de inúmeros microrganismos patogênicos, fungos e leveduras e também dos *Lactobacillus* (RIBAS, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SOUZA, 2016). O conhecimento da composição do leite é essencial para a obtenção de produtos lácteos e seus derivados (DURR, 2004; SOUZA, 2016).

Entende-se por produto lácteo o produto obtido mediante qualquer elaboração do leite que pode conter aditivos alimentícios e ingredientes funcionalmente necessários para sua elaboração (BRASIL, 2005). Pode-se observar um aumento significativo na demanda por alimentos nutritivos e seguros. As indústrias alimentícias, comprometidas em promover saúde e prevenir doenças, têm desenvolvido e aplicado tecnologias na produção de alimentos funcionais, com baixo teor de calorias, vitaminados e com adição de minerais (TEIXEIRA, 2006; VIEIRA, 2009; SALOTTI-SOUZA, 2017).

Dada à importância destes alimentos, os produtos lácteos fermentados são uma das opções. Entre eles, as bebidas lácteas fermentadas, que são fontes de cálcio e proteínas de baixo custo de produção e baixo preço final para o consumidor, por poderem carrear probióticos e serem reconhecidas como produtos saudáveis. E por isso, têm seu reconhecimento pelos profissionais de saúde que estimulam o seu consumo (THAMER e PENNA, 2006; DOS REIS, 2013).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, do MAPA, Instrução Normativa nº 16 de 2005:

Entende-se por bebida Láctea o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) alimentício(s) ou substância alimentícia, gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005).

Esta instrução normativa define que bebida láctea a base de soro de leite pode ter variações quanto ao tratamento térmico, fermentação e adição de substâncias, o que resulta na



UNICEPLAC

produção de diversos produtos, entre eles, a bebida láctea fermentada (REIS, 2013).

Na legislação brasileira, a instrução normativa 16 de 23 de agosto de 2005 do MAPA, define como Bebida Láctea Fermentada o produto com a mesma definição de bebida láctea, acrescido do processo de fermentação, que consiste a partir da ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação (BRASIL, 2005). É relatado na Norma Interna SDA nº 4 de 2013, atualizada em julho de 2019, que a contagem total de bactérias ácido lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias/grama (UFC/g), no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2013).

As bactérias ácido lácticas (BAL's) compõem um grande grupo de microrganismos que são encontrados naturalmente em alimentos ricos em carboidratos, produtos de degradação de proteínas, vitaminas e alimentos com baixa tensão de oxigênio. Isso explica a prevalência dessas bactérias no leite. Além de alimentos, ainda podem estar presentes em solo, água e atuando na microbiota de seres humanos e animais (LÓPEZ - DÍAZ *et al.*, 2000; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; SETTANNI e MOSCHETTI, 2010; SOUZA, 2016).

BAL's são microrganismos Gram positivos, anaeróbicos, aerotolerantes e acidotolerantes, catalase negativa, não formadores de esporos, produtores de ácido láctico proveniente de seu metabolismo fermentativo (MARTINIS *et al.*, 2003a; AXELSSON, 2004; LEROY e VUYST, 2004).

Liu *et al.* (2014) classificaram BAL's em espécies e gêneros de acordo com seus modos de fermentação, características fisiológicas, faixas de temperatura para o crescimento e utilização de açúcar. São ainda classificadas de acordo com sua capacidade de fermentação da lactose através de seu metabolismo homofermentativo, quando produzem apenas ácido láctico como produto final; ou heterofermentativo, quando além de ácido láctico, produzem também substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (AXELSSON, 2004; BRUNO e CARVALHO, 2009).

BAL's possuem grande importância na indústria alimentar e em saúde pública por suas propriedades transformadoras, deteriorantes, probióticas e bioconservadoras (MARTINIS *et al.*, 2003a). São utilizadas como agentes conservadores de alimentos, geradores de aromas e formação de textura nos produtos lácteos fermentados (DELAVENNE *et al.*, 2012; WIDYASTUTI *et al.*, 2014).

Além de inibir o crescimento bacteriano, tem sido demonstrado que BAL's podem



UNICEPLAC

interferir na expressão gênica de patógenos de origem alimentar como *Staphylococcus aureus*, impedindo a produção de endotoxinas estafilocócicas (EVEN *et al.*, 2009; CRETENET *et al.*, 2011; SERIDAN *et al.*, 2012). A possibilidade destes microrganismos vivos em produtos lácteos fermentados, serem capazes de manter o equilíbrio entre bactérias patogênicas e não patogênicas fez com que as BAL's fossem estudadas com relação aos seus efeitos probióticos (SAARELA *et al.*, 2000; SALOTTI-SOUZA, 2017)

De acordo com o descrito por Franco e Landgraf (2008), a capacidade de microrganismos de sobreviverem ou de multiplicarem-se depende de uma série de fatores. Entre eles, incluem-se substratos aos quais estão inseridos, sendo preferenciais os que proporcionam maior troca de nutrientes com os microrganismos, e ambiente em que se encontram, como temperatura ambiente e pH.

O gênero *Lactobacillus spp.* encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente, sua ocorrência é influenciada por diversos fatores ambientais, como pH, presença ou ausência de oxigênio, e interações com outras bactérias (GILLILAND *et al.*, 2002). São bacilos, gram positivos, catalase negativos, aparecem em cadeias curtas ou de forma individualizada, produzem D-lactato e acetaldeído a partir da lactose do leite (ORDÓÑEZ-PEREDA *et al.*, 2005). O seu pH ótimo de crescimento situa-se na faixa de 5,5 e 6,3 e possuem faixa ótima de temperatura entre 30-40°C (GOMES e MALCATA, 1999; SOUZA, 2016).

Há cada vez mais evidências propondo que algumas BAL's, como *Lactobacillus*, quando consumidos em quantidades consideravelmente grandes, apresentam propriedades profiláticas e terapêuticas em humanos e animais. (MACEDO, 2005; SACCARO, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008; SOUZA, 2016).

Streptococcus thermophilus são cocos que formam cadeias, gram positivos, catalase negativos, produzem L-lactato, acetaldeído e diacetil a partir da lactose do leite, e algumas cepas produzem exopolissacarídeos, sendo 6,5 o seu pH ótimo de crescimento (RAULT *et al.*, 2009). Se multiplicam em temperatura ótima de 37°C, porém a grande maioria das cepas multiplica a 50°C e sobrevivem à pasteurização, sendo denominados termodúricos (ORDÓÑEZ-PEREIRA *et al.*, 2005).

Diante do exposto, objetivou-se verificar o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas em bebida láctea fermentada. Além disso, foi avaliada a influência do tempo de refrigeração da bebida láctea fermentada na viabilidade de Bactérias ácido lácticas em diferentes tempos.



UNICEPLAC

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 Obtenção e transporte das bebidas lácteas fermentadas

Foram adquiridas de estabelecimento comercial submetido a fiscalização localizado na região do Gama – DF, dois tipos de bebidas lácteas fermentadas de mesma marca e mesmo lote e estando dentro do prazo de validade, denominadas como amostra A e amostra B, acrescidas de polpas de côco e salada de frutas (morango, goiaba, pêsego e mamão), respectivamente. As amostras foram armazenadas em caixa isotérmica contendo gelo e transportadas para o laboratório de microbiologia do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC), para posterior análise.

2.2 Preparo das alíquotas

Foram alíquotados 100 mL de cada produto e transferidos para recipientes de vidro autoclavados, identificados com lote do produto, data de fabricação e data de validade de cada amostra, onde foram acondicionadas em geladeira na temperatura de 7° C, até a realização das análises, que foram dispostas em: D0, D5, D10, D15, D20, D30, D40, sendo considerado como dia 0 o dia da aquisição e os demais dias consecutivamente.

2.3 Análise de viabilidade de bactérias ácido lácticas em bebidas lácteas fermentadas em diferentes tempos

As amostras foram homogeneizadas e submetidas a diluições decimais seriadas até 10^{-5} em solução salina a 0,85% para a realização das análises microbiológicas.

Segundo a metodologia descrita por Nero *et al.* (2006) e Ortolani *et al.* (2007), a partir da diluição decimal 10^{-5} , o volume de 0,1mL foi inoculado em placas de Petri com agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS-KASVI®) e M17 (SIGMA-ALDRICH®), meios específicos para crescimento de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em duplicata, acondicionadas em jarras de anaerobiose e incubadas a 35°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em (UFC/mL). As bactérias ácido lácticas, foram classificadas de acordo com a morfologia, coloração de Gram e produção de catalase, a fim de se identificar características típicas de BAL's. O mesmo procedimento foi realizado nos



UNICEPLAC

demais dias em suas respectivas amostras.

3 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados das análises de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* nos diferentes períodos avaliados apresentam-se demonstrados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados obtidos na contagem de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

DILUIÇÃO/ DIA	BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA (POLPA DE CÔCO)			BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA (POLPA DE SALADA DE FRUTAS)		
	Amostra A			Amostra B		
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bactérias ácido lácticas totais	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bactérias ácido lácticas totais
D0	-	-	-	-	-	-
D5	2,5 X10 ⁵	-	2,5 X10 ⁵	1,45 X10 ⁶	-	1,45 X10 ⁶
D10	1,15 X10 ⁶	-	1,15 X10 ⁶	1,25 X10 ⁶	-	1,25 X10 ⁶
D15	1,1 X10 ⁶	-	1,1 X10 ⁶	8,5 X10 ⁵	-	8,5 X10 ⁵
D20	1,1 X10 ⁶	-	1,1 X10 ⁶	1,55 X10 ⁶	-	1,55 X10 ⁶
D30	1,15 X10 ⁶	-	1,15 X10 ⁶	9,9 X10 ⁶	-	9,9 X10 ⁶
D40	3,45 X10 ⁶	-	3,45 X10 ⁶	9 X10 ⁵	-	9 X10 ⁵

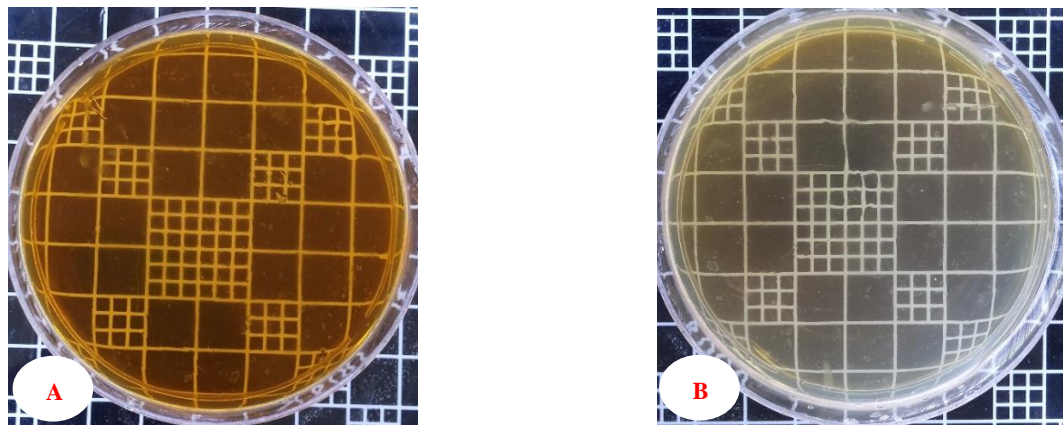
*A contagem total de bactérias ácido lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10⁶ Unidades Formadoras de Colônias/mililitro (UFC/mL) (BRASIL, 2013).

As amostras apresentaram valores satisfatórios, dentro do padrão exigido por lei, com exceção de períodos distintos, em que apresentaram valores insatisfatórios nas contagens das UFC's, em que a soma dos microrganismos avaliados não atingiu o valor mínimo exigido de 10⁶, sendo esses, D0 onde não houve crescimento de nenhuma colônia em ambas as amostras (figura 1), D5, onde a amostra A apresentou-se abaixo do limite mínimo (2,5 x10⁵), e nos períodos D15 e D40 a amostra B não atingiu o limite mínimo exigido (8,5 x10⁵ e 9 x10⁵, respectivamente), sendo importante ressaltar que no D40 (figura 2) os produtos já estavam com o prazo de validade excedido.



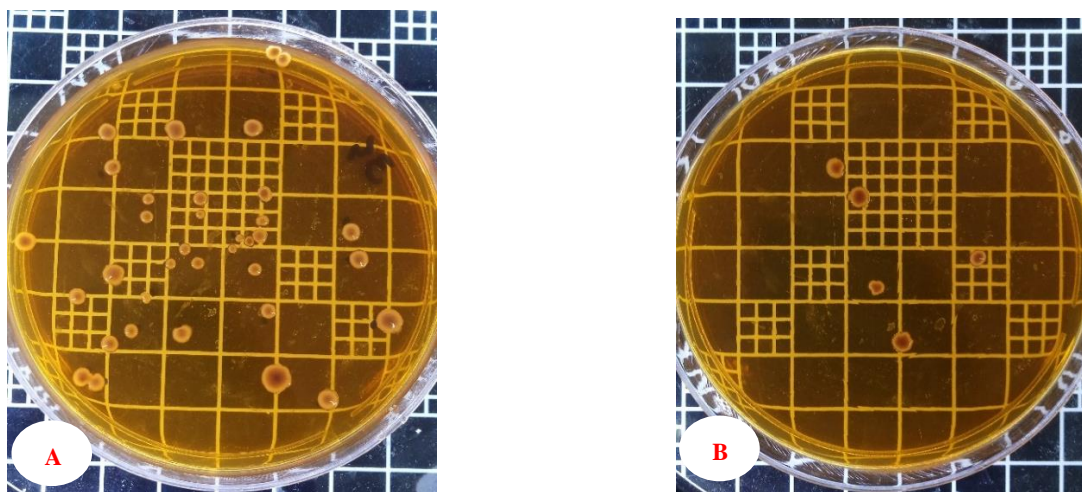
UNICEPLAC

Figura 1: (A) Ausência de colônias de *Lactobacillus bulgaricus* no D0 e (B) Ausência de colônias de *Streptococcus thermophilus* no D0.



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 2: (A) Colônias de *Lactobacillus bulgaricus* (amostra A) e (B) Colônias de *Lactobacillus bulgaricus* (amostra B) no D40.



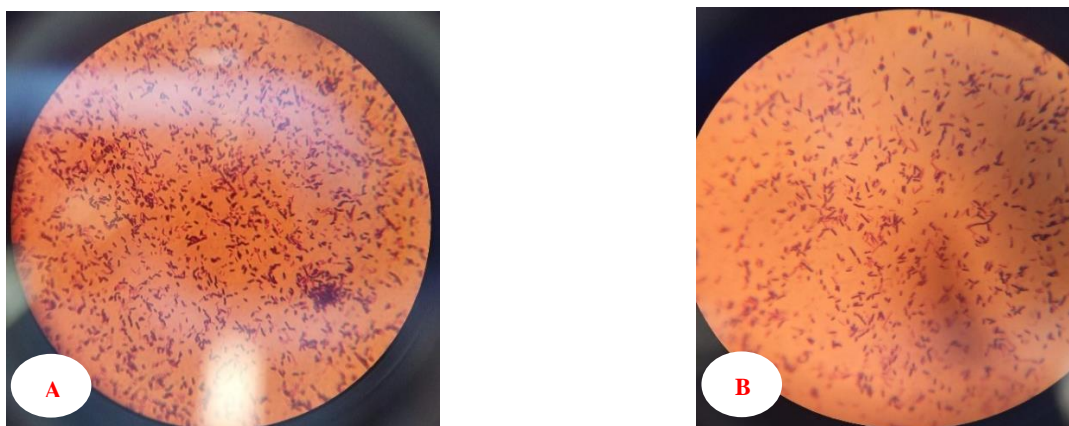
Fonte: Do autor, 2019.

No processo de fermentação da bebida láctea, inicialmente o *Streptococcus thermophilus* metaboliza a lactose realizando a produção de ácido lático, que diminui o pH e favorece o crescimento dos *Lactobacillus*. Por sua vez, o *Lactobacillus bulgaricus* libera, a partir da degradação de proteínas lácticas, diversos aminoácidos, que estimulam o crescimento do *Streptococcus*. Sendo assim, uma bactéria favorece o desenvolvimento da outra (SIEUWERTS *et al.*, 2010). Essa relação é denominada protocooperação, já que não existe dependência uma da outra para sobrevivência. Essas bactérias produzem mais ácido na forma de cultura mista do que como culturas isoladas (SOARES, 2011).



UNICEPLAC

Figura 3: (A) Coloração de Gram: *Lactobacillus bulgaricus* da amostra A e (B) Coloração de Gram: *Lactobacillus bulgaricus* da amostra B.



Fonte: Do autor, 2019.

O crescimento de BAL's na amostra A foi satisfatório, embora tenha se dado apenas pelo crescimento de *Lactobacillus spp.* apresentando valor abaixo do padrão estabelecido apenas nos momentos D0 e D5, nos dias posteriores manteve-se uma média aproximada, tendo considerável aumento de UFC's após vencimento do prazo de validade, conforme tabela 1. Na amostra B foram observadas variações na quantidade de UFC/mL de *Lactobacillus bulgaricus* nos diferentes períodos (Tabela 1).

De acordo com Macedo *et al.* (2008) e Damin *et al.* (2009) este comportamento pode estar relacionado a vários fatores como acidificação do produto, permeação do oxigênio através da embalagem, compostos antimicrobianos que podem reduzir a viabilidade de bactérias probióticas, e principalmente, aos tipos de microrganismos utilizados na fermentação do produto e seu poder de pós-acidificação. Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (2002), aponta-se a perda de viabilidade desses microrganismos quando estocados por longos dias sob temperatura de refrigeração. Diante do exposto, os resultados observados sugerem que a acidificação do produto durante o tempo de armazenamento e exposição ao oxigênio durante o manuseio das alíquotas, possivelmente contribuíram para a inviabilidade do meio em relação ao desenvolvimento do *Streptococcus spp.*, bem como o favorecimento do crescimento de *Lactobacillus spp.*

Pode-se observar (Tabela 1) que durante o tempo de estudo *Streptococcus thermophilus* mantiveram-se ausentes, não sendo observado crescimento de colônias em ambas amostras. *Lactobacillus bulgaricus* resistem melhor a valores de pH baixos e tendem a superar a



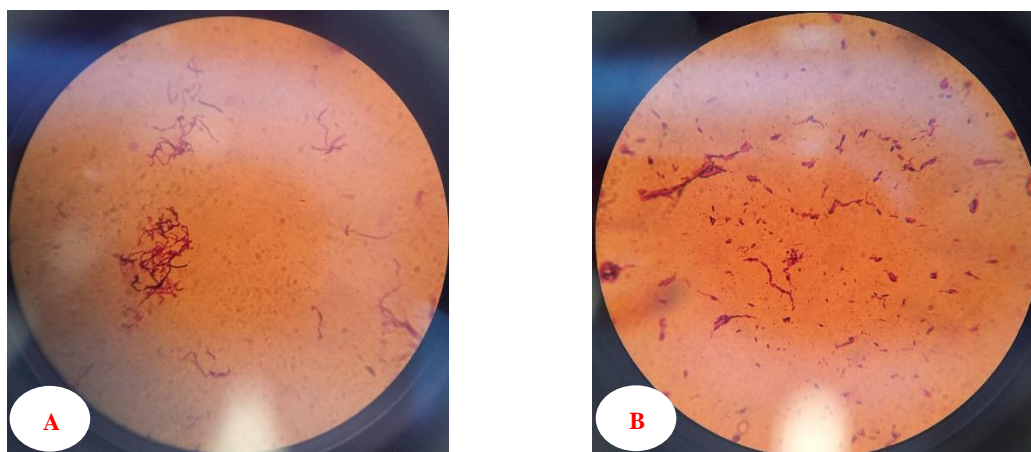
UNICEPLAC

população de *Streptococcus thermophilus* quando o pH é inferior a 4,0, que é o mais frequentemente encontrado (ARYANA, 2017). Assim, os resultados observados na presente pesquisa, sugerem que uma queda brusca do pH pode ter favorecido o desenvolvimento de colônias de *Lactobacillus* spp. e inibido o crescimento de *Streptococcus* spp. devido a sua baixa resistência a pH ácido.

Um estudo realizado por Harmstorf e Phillips (2008), apresentou significativa queda dos valores de pH e promoção de acidez durante o período de armazenamento dos diferentes tipos de iogurtes avaliados. Eles atribuíram estes resultados obtidos a uma provável continuidade do processo de fermentação pelas BAL's, embora os iogurtes tenham sido fabricados utilizando apenas *Streptococcus thermophilus*. Já em estudo realizado por Antunes *et al.* (2005), os autores relataram que a pós-acidificação observada ocorreu principalmente em função da presença do *Lactobacillus bulgaricus*.

É importante ressaltar que em todos os ensaios houve crescimento de colônias fúngicas, em ambas as amostras, em M17 (figura 4), o que possivelmente demonstra uma menor resistência do *Streptococcus thermophilus* às relações antagônicas entre microrganismos. Leveduras são frequentemente detectadas em elevada contagem em produtos lácteos, refletindo uma boa adaptação no substrato rico em proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos orgânicos (LOPANDIC *et al.*, 2006; ZAMBONIM, 2014). O *Streptococcus thermophilus*, bactéria iniciadora na fermentação (cultura *starter*), possui habilidade de baixar o pH rapidamente e proporcionar ambiente favorável para *Lactobacillus bulgaricus*, (ERKUS *et al.*, 2013), conseqüentemente favorecendo também culturas fúngicas.

Figura 4: (A) Hifas fúngicas D10 e (B) Hifas fúngicas D40.



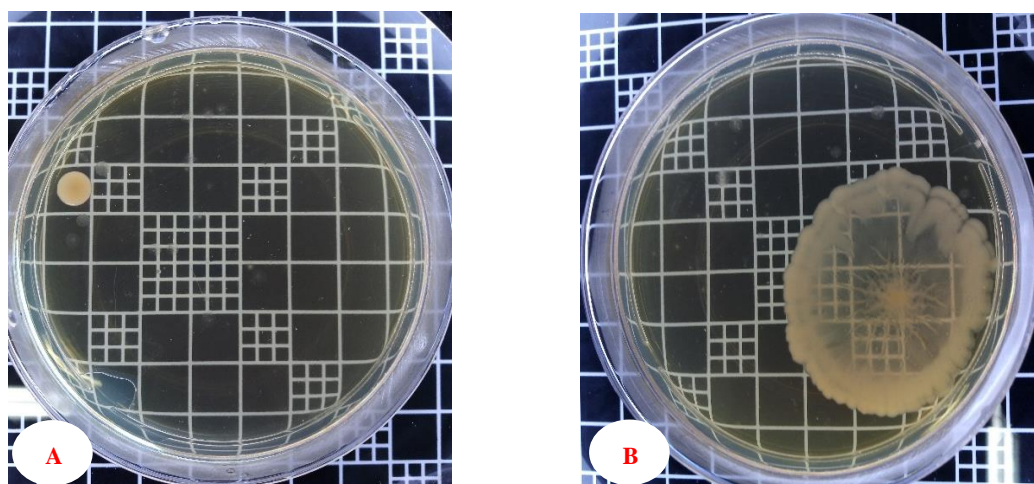
Fonte: Do autor, 2019.



UNICEPLAC

As leveduras podem interagir com outros microrganismos de diferentes formas, inibindo ou eliminando microrganismos indesejáveis. Podem também agir inibindo culturas *starters* (JAKOBSEN e NARVHUS, 1996; ZAMBONIM, 2014). Um aumento da deterioração é observado quando iogurtes são suplementados com frutas, mel, castanhas ou açúcar. Esses ingredientes são fontes de contaminação e fornecem nutrientes para crescimento e fermentação das leveduras (JAKOBSEN e NARVHUS, 1996; ZAMBONIM, 2014). Diante do mencionado, justifica-se a prevalência de culturas fúngicas na amostra B, de bebida láctea fermentada acrescida de polpa de salada de frutas (morango, goiaba, mamão e pêsego), tornando-a mais ácida que a amostra A, cuja bebida foi acrescida apenas de polpa sabor côco.

Figura 5: (A) Colônias fúngicas da amostra A e (B) Colônias fúngicas da amostra B, no D20.



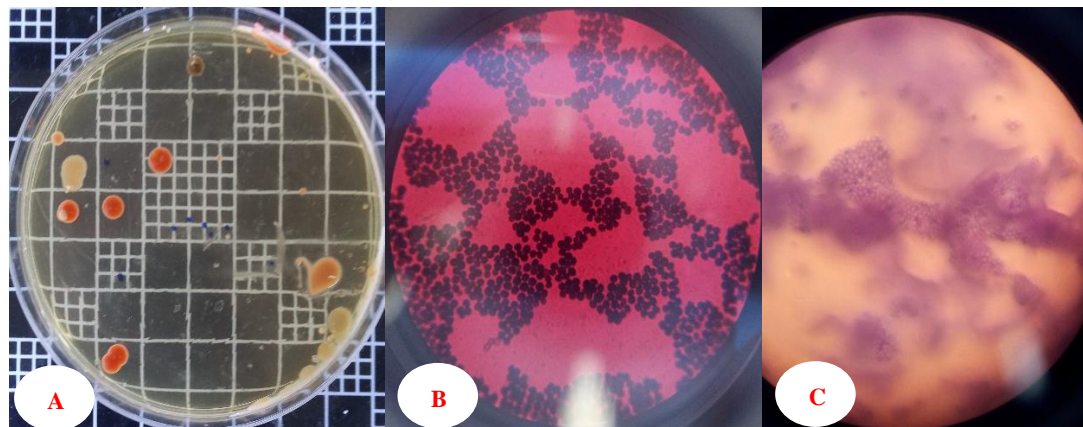
Fonte: Do autor, 2019.

No momento D15, houve desenvolvimento de colônias alaranjadas de textura cremosa em meio M17, referente a bebida láctea fermentada sabor salada de frutas. Segundo Diktas *et al.* (2013) colônias que se apresentam úmidas, brilhantes e de coloração rosa-salmão a vermelho-coral, correspondem a leveduras do gênero *Rhodotorula* spp., que observadas na coloração de Gram apresentaram-se em estrutura ovoide e Gram positiva. Estudos realizados por Caggia *et al.* (2001) e Minervini *et al.* (2001) revelam que dentre as principais espécies de leveduras isoladas de produtos lácteos encontra-se o gênero *Rhodotorula* spp..



UNICEPLAC

Figura 6: (A) Colônias fúngicas gênero *Rhodotorulla* spp. da amostra B; (B) Coloração de Gram e (C) Coloração com azul de metileno, no D15.

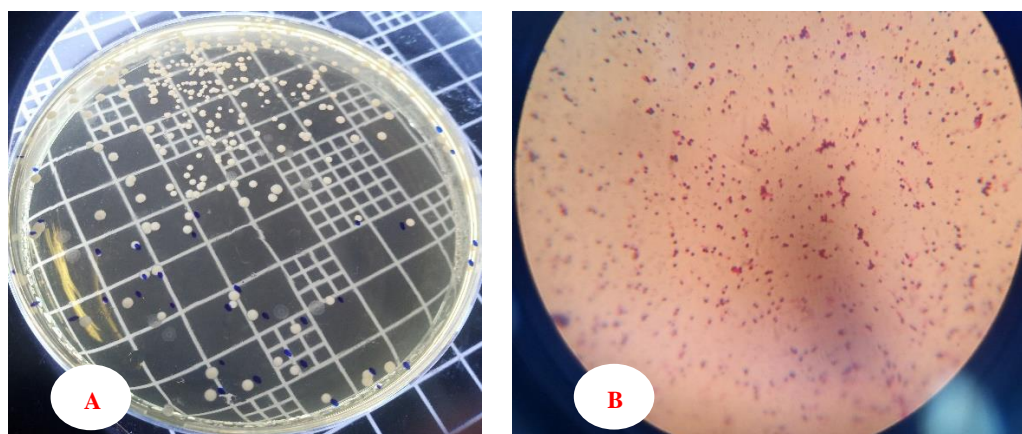


Fonte: Do autor, 2019.

No D5, uma das placas da duplicata de meio M17 correspondente a amostra B, apresentou colônias que morfologicamente eram condizentes a *Streptococcus thermophilus*, porém nos testes de catalase, obteve-se resultado positivo, contraponto a característica do *S. thermophilus* de ser não produtor de catalase. Seguindo o protocolo de coloração de Gram, apresentou-se positivo (figura 7).

Nota-se que esta placa possui uma grande quantidade de colônias fúngicas (figura 7), que são produtoras de catalase. Mesmo realizando os testes de catalase e coloração de Gram em colônias dos supostos *S. thermophilus* mais distantes das colônias fúngicas, os mesmos resultados eram encontrados. Portanto, associou-se a obtenção destes resultados a contaminação das colônias de cocos pela presença das colônias fúngicas.

Figura 7: (A) Colônias em M17 amostra B - D5; e (B) Cocos Gram positivos.



Fonte: Do autor, 2019.



UNICEPLAC

Devido ao teste de catalase apresentar um resultado positivo, o que não é uma característica do *Streptococcus thermophilus*, e na coloração de Gram não ter sido possível diferenciá-lo de outros cocos Gram positivos, optou-se por não contabilizar estas UFC's no resultado final.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que as análises de bebida láctea fermentada, acrescidas de polpa sabor côco e polpa sabor salada de frutas, apresentaram resultados favoráveis ao padrão legal, na maioria dos períodos de armazenagem sob refrigeração. Todavia, observa-se que os diferentes substratos avaliados são capazes de promover diferentes desenvolvimentos da microbiota presente nos produtos. Assim sendo, pode-se afirmar que durante o armazenamento fatores como acidificação do meio, exposição ao oxigênio, compostos antimicrobianos e microrganismos próprios desse derivado lácteo podem interferir diretamente na viabilidade e desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. E. C. *et al.* Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 58, n. 3, p. 169- 173, Aug. 2005.
- ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, Elsevier, v. 100, p. 9987-10013, Dez. 2017.
- AXELSSON, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects**. 3ª ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 166.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 23 ago 2005. Seção 1, p. 7-10.
- BRASIL, Portaria nº 2914 de 14 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**. Brasília. DF. 14 dez. 2011.
- BRASIL, Norma Interna SDA nº 04, de 16 de dezembro de 2013. Programa de avaliação de conformidade de padrões físico- químicos e microbiológicos de produtos de origem animal



UNICEPLAC

comestíveis e água de abastecimento de estabelecimentos registrados e relacionados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) e de produtos de origem animal comestíveis importados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 16 dez. 2013.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, CE, 2009.

CAGGIA, C. *et al.* Identification of *Picchia anômala* isolated from yogurt by RELP of ITS region. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, n.1, p. 71-73, 2001.

CRETENET, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 340–351, 2011.

DAMIN, M. R. *et al.* Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1744- 1750, 2009.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 29, 114-119, 2003a.

DEVALENNE, E. *et al.* Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 185-190, 2012.

DIKTAS, H. Intraabdominal abscess related fungaemia caused by *Rhodotorula glutinis* in a non-neutropenic cancer patient. **Acta Clinica Belgica**, 2013.

DOS REIS, D. L. Qualidade e inocuidade microbiológica de derivados lácteos fermentados produzidos no Distrito Federal, Brasil. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de Brasília, 2013.

DÜRR, J. W. *et al.* O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, p. 38-55, 2004.

ERKUS, Oylum. *et al.* High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yoghurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2013.

EVEN, S *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4459–4472, 2009.

FRANCO, B. D. G. M. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ateneu, p. 182, 2008.

GARCIA, F. R. C. Avaliação do desempenho de um reator anaeróbio compartimentado no tratamento de soro de queijo. 2009. 108f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência**



UNICEPLAC

de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

GILLILAND, S. E. *et al.* Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacterial in a Yogurt-like product. **JFS: Food Microbiology and Safety**. Vol. 67, Nr. 8, 2002.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4, p. 139-157, 1999.

HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* spp. Lactis in stirred fruit yogurts. **Food Science and Technology**, London, v. 48, p. 1317- 1322, 2008.

HOLZAPFEL, H. W. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 73, 365S-373S, 2011.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **Internation Dairy Journal**, v. 6, n. 8-9, p.755-768, 1995.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, 15, 67-78, 2004.

LIU, S. N.; HAN, Y.; ZHOU, Z. J. Lactic acid bacteria in traditional fermented chinese foods. **Food Research International**, v.44, p.643-651, 2011.

LOPANDIC, K. *et al.* Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 341- 350, 2006.

LOPÉZ-DIAZ, T. M. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n.1, 23-32, 2000.

MACEDO, L. N. *et al.* Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 935- 942, 2008.

MACEDO, R. E. F.; Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado. **(Tese) Doutorado em tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 205, 2005.

MINERVINI, F. *et al.* Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1- 2, p. 141-146, 2001.

NASCIMENTO, M.; MORENO, I.; KUAYE, A. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2008.

NERO, L. A. *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**



UNICEPLAC

Microbiology, v. 14, p 249-257, jul 2006.

OLIVEIRA, M. N. *et al.* Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2013.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. *et al.* **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 55-87, 2005.

ORTOLANI, M. B. T. *et al.* Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture média in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 387-391, jul. 2007.

RAULT, A. *et al.* Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4374-4381, jul. 2009.

RIBAS, L. C. M. Higienização de instalações e equipamentos em indústria de laticínios. **Monografia** (Especialização Lato Sensu em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Goiânia, p.74, 2008.

RUZ-PERES, M. Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 93, 2005.

SAARELA, M. *et al.* Probiotic bactéria: safety, functional and technological propertiers. **Journal of Biotechnology**. v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SACCARO, D. M. Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado. 101 f. (**Dissertação**) - **Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**). – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 101, 2008.

SALOTTI-SOUZA, B. M; BRUNARI, N. C. Bactérias probióticas e sua aplicação em leites fermentados. **Rev Cient Med Vet**. 2017; 1(1):22-29.

SERIDAN, B. *et al.* Viabilidade de Staphylococcus aureus FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de Lactobacillus rhamnosus e Lactococcus lactis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 465-470, 2012.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n.6, p. 691–697, 2010.

SOARES, D. S. *et al.* Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.996-1002, 2011.

SOUZA, S. M. O. Estudo da interferência de substratos orgânicos na ação do ozônio sobre microrganismos deteriorantes, benéficos e patogênicos. **Tese de Doutorado em Ciências Animais** – Universidade de Brasília, 2016.



UNICEPLAC

SIEUWERTS, S. *et al.* Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.76, n.23, p.7775-7784, 2010.

TEIXEIRA, L. J. Q. *et al.* Hábitos de consumo de frutas entre estudantes da Universidade Federal de Viçosa. **Revista Ceres**, Viçosa, v.53, n.307, p. 366- 373, 2006.

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

VIEIRA, A. C. P. A percepção do consumidor diante dos riscos alimentares: A importância da segurança dos alimentos. **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, XII, n. 68, set 2009.

WIDYASTUTI, Y.; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, A. The role of lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 4, p. 435-442, 2014.

ZAMBONIM, M. C. Caracterização de leveduras promotoras de estufamento em iogurte com polpa de fruta. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 74, 2014.



UNICEPLAC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me preparou para que chegasse até aqui e que sempre me conduziu quando parecia ser impossível.

Aos meus avós, que sempre foram meus maiores incentivos e inspiração. Por não desacreditarem de mim em nenhum momento, e por me apoiarem durante todo o meu caminho.

A minha mãe, que não mediu esforços para que este sonho se realizasse. Por todo amor e carinho que me foram proporcionados.

Ao meu noivo, que me acompanhou diariamente e me ajudou a superar todos os obstáculos que surgiram pelo caminho.

Ao meu pai, um homem de fé que sempre me instruiu a perseverar e acreditar no que Deus pode fazer por mim.

A todos os meu familiares, que me ajudaram direta e indiretamente nesta conquista.

A professora Stefania Marcia, por toda a paciência, carinho e conhecimento compartilhado para a realização deste trabalho.

A Wendy, que sempre se dedicou a me ajudar nos experimentos que foram realizados no decorrer deste trabalho.