

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

BRUNA THAIS ROSSETTO

**VIABILIDADE DO USO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM MARCAS
COMERCIALIZADAS DE LEITE FERMENTADO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2015**

BRUNA THAIS ROSSETTO

**VIABILIDADE DO USO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM MARCAS
COMERCIALIZADAS DE LEITE FERMENTADO**

Projeto referente ao Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso Bacharelado em Química da UTFPR – Câmpus Pato Branco.

Professor Orientador: Dr. Solange Teresinha Carpes.

Pato Branco, 2015

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado Viabilidade do uso de bactérias lácticas em marcas comercializadas de leite fermentado foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 7.1.2015-B de 2015.

Fizeram parte da banca os professores.



Solange Terezinha Carpes



Mariana Leite Mitterer Daltoe



Roberta Roncatti

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que me fortaleceu, abençoou e amparou em todas as fases da minha pesquisa e graduação.

A instituição de ensino UTFPR, campus Pato Branco por proporcionar um ensino de qualidade e competência, a minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Solange Terezinha Carpes por toda dedicação e contribuição para esse trabalho logo como a Técnica Laboratorial Roberta Roncatti por todo tempo disponibilizado em atender as minhas dificuldades por todo apoio técnico e emocional.

Aos meus pais Nelci e Cleomar Rossetto por estarem presentes e toda essa etapa da minha vida, em especial ao meu pai que dedicou grande parte de si em me ajudar e apoiar durante todos esses anos. E dizer a eles que ajudaram a construir tudo que tenho e tudo que sou hoje.

Ao meu sogro e sogra Rozeli e Luiz Fernando Geron por contribuírem de forma significativa para a conclusão desse curso, estando ao meu lado e incentivando de forma produtiva as minhas decisões.

Por fim ao meu amado noivo Matheus Luiz Geron, que esteve comigo em todos os momentos desta etapa tão difícil da minha vida, por toda sua paciência, compreensão, carinho, dedicação e amor. Por muitas vezes me ajudar a encontrar soluções quando elas pareciam não existir. E com palavras de ânimo e incentivo que sempre mudaram o rumo das minhas angústias. Você foi a pessoa que durante todo este processo esteve ao meu lado e compartilhou comigo os momentos de tristezas e alegrias. Além deste trabalho, dedico á você todo meu amor pelo resto da minha vida.

RESUMO

Atualmente esta em fase crescente a busca por uma vida saudável e nutricionalmente correta, e os alimentos que atendem a estas especificações tem sido cada vez mais aceitos pela população. Em função disto indústrias realizam pesquisas que visam o emprego de microrganismos que contribuam com esse estilo de vida saudável, um grande exemplo de alimento funcional são os leites fermentados acrescidos de bactérias lácticas que tem como função regular o sistema digestivo tal como o aumento da imunidade do organismo humano. O presente estudo teve como finalidade avaliar a viabilidade dessas bactérias, bem como as características físico-químicas e microbiológicas de três marcas comercializadas de leite fermentado verificando se as mesmas estavam dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira. Os valores encontrados em praticamente todas as análises realizadas atendem aos parâmetros exigidos pelo país, sendo que a contagem de bactérias lácticas superaram os valores exigidos, desta forma garantido que todos os produtos avaliados nesta pesquisa contribuem de maneira positiva para saúde da população que os consome.

Palavras Chave: Bactérias Lácticas, Probióticos, Leite fermentado.

ABSTRACT

Currently this growing phase in the search for a healthy and nutritionally correct life, and foods that meet those specifications have been increasingly accepted by the population. Because of this industry conduct research aimed at the use of microorganisms that contribute to this healthy lifestyle, a great example of functional food are fermented milk plus lactic acid bacteria which is to regulate the digestive system function such as increased immunity human organism. The present study was to evaluate the viability of these bacteria as well as the physicochemical and microbiological characteristics of three brands marketed fermented milk checking whether they were within the parameters required by Brazilian law. The values found in all analyzes meet the parameters required by the country, and the lactic acid bacterial count exceeded the amounts required in this way guaranteed that all products evaluated in this study contribute positively to health of the population that consumes them.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, fermented milk.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios físico-químicos estabelecidos pela legislação brasileira, para leite fermentado.....	20
Tabela 2: Critérios físico-químicos para leite fermentado estabelecidos por trabalhos científicos semelhantes ao realizado.....	21
Tabela 3: Parâmetros microbiológicos para leite fermentado.....	21
Tabela 4: Contagem de microrganismos específico para a inspeção de leites fermentados no Brasil.....	22
Tabela 5: Análises físico-químicas realizadas para diferentes marcas de leite fermentado.....	34
Tabela 6: Contagem de bactérias lácticas viáveis em diferentes marcas de leite fermentado.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contagem microbiológica de bactérias lácticas do leite fermentado da marca A.....	46
Figura 2: Contagem microbiológica de bactérias lácticas do leite fermentado da marca B.....	47
Figura 3: Contagem microbiológica de bactérias lácticas do leite fermentado da marca C.....	47

LISTA DE FOTOGRAFIA

Fotografia 1: Análise de coliformes totais para uma marca de leite fermentado.....	42
Fotografia 2: Contagem de bactérias lácticas, próxima a data de validade em uma diluição de 10^{-8}	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1 LEITE	14
3.2 LEITE FERMENTADO	15
3.3 BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	16
3.4 PROBIÓTICOS	17
3.5 GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i>	18
3.6 ETAPAS DA PRODUÇÃO COMERCIAL DE LEITE FERMENTADO	18
3.7 CRITÉRIO FÍSICO-QUÍMICOS PREVISTO PARA LEITE FERMENTADO	20
3.8 CRITÉRIO MICROBIOLÓGICO PREVISTO PARA LEITE FERMENTADO.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA LEITE FERMENTADO	22
4.1.1 Determinação do teor de proteína.....	22
4.1.2 Determinação do teor de acidez.....	23
4.1.3 Determinação do pH	24
4.1.4 Determinação de sólidos totais	24
4.1.5 Determinação de sólidos fixos.....	25
4.1.6 Determinação de sólidos voláteis.....	25
4.1.7 Determinação de cinzas	26
4.1.8 Determinação do teor de lipídeos.....	26
4.1.9 Determinação do teor de umidade	27
4.1.10 Determinação de açúcares redutores em lactose	28
4.1.11 Determinação de açúcares não redutores em sacarose	28
4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS PARA LEITE FERMENTADO	29
4.2.1 Coliformes totais.....	30
4.2.2 Coliformes termotolerantes	31
4.2.3 Isolamento de <i>salmonella spp</i>	31

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular da cultura láctea do leite fermentado.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	35
5.1.1 Proteína.....	35
5.1.2 pH e acidez	35
5.1.3 Teor de sólidos.....	37
5.1.4 Cinzas	39
5.1.5 Lípidios.....	39
5.1.6 Umidade.....	40
5.1.7 Açúcares redutores e não redutores	41
5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	42
5.2.1 Coliformes totais e termotolerantes.....	42
5.2.2 Isolamento de <i>Salmonella spp</i>	43
5.2.3 Contagem de bactérias lácticas viáveis.....	43
6 CONCLUSÃO	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais há uma busca eminente por qualidade de vida, e quando tratamos deste assunto a saúde é um agente determinante, pois interfere diretamente no bem estar do ser humano.

Melhorar a saúde vem sendo uma busca contínua e os alimentos que ingerimos em nosso dia a dia contribuem para o bem estar e qualidade de vida. Um alimento que vem chamando a atenção por seus benefícios funcionais é o leite fermentado, que tem como objetivo principal melhorar o funcionamento do intestino.

Durante muito tempo o ser humano tem buscado a ajuda de microrganismos que auxiliem no equilíbrio do organismo, ao longo do mesmo realizou-se análises que comprovam a atuação de algumas bactérias que realizam essa tarefa. As bactérias ácido lácticas são um ótimo exemplo de bactérias que tem como finalidade aumentar o nível de imunidade do organismo. Pois elas contêm propriedades que agem estimulando o crescimento de bactérias benéficas em nosso intestino.

O leite que estaremos tratando é fermentado por bactérias chamadas de *Lactobacillus* que conseguem resistir a acidez do estômago e chegam vivas em maior quantidade ao intestino, regularizando as funções intestinais e realizando a proteção do sistema digestório. Outra característica bastante relevante é que essas bactérias são consideradas microrganismos probióticos, ou seja, organismos vivos que quando ingeridos em determinada concentração exercem efeitos benéficos para a saúde por sua ação no trato intestinal, juntamente com o controle do colesterol e de diarreias e também reduzindo o risco de câncer.

O objetivo do presente projeto foi analisar três marcas de diferentes leites fermentados já existentes no mercado quanto as propriedades físico-químicas e microbiológicas segundo o que preconiza a Legislação Brasileira para esse alimento.

As análises realizadas respeitaram o prazo de fabricação e validade estabelecido pelo fabricante do leite fermentado, e os métodos utilizados para a determinação dos resultados foram de acordo com as normativas previstas pela legislação vigente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar três marcas de leite fermentado já existentes no mercado e determinar se as mesmas possuem as características e propriedades físico-químicas e microbiológicas prevista pela legislação brasileira ao longo de seu prazo de validade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar análises físico-químicas como:

- Teor de proteína,
- Determinação de acidez,
- Verificação do pH,
- Sólidos totais,
- Sólidos fixos,
- Sólidos voláteis,
- Cinzas,
- Lipídeos,
- Umidade,
- Açúcares redutores em lactose,
- Açúcares não redutores em sacarose

As análises microbiológicas consistiram na contagem:

- Coliformes totais,
- Coliformes termotolerantes,
- Pesquisa de *Salmonella spp*,
- Avaliação da viabilidade celular da cultura láctea dos leites fermentados.

Sabendo que a viabilidade celular de bactérias lácteas é a análise principal a ser realizada pois é ela que determina se o produto ao longo de sua vida de prateleira continua mantendo as propriedades benéficas necessárias ao organismo humano, em função disto, as análises para esse método serão realizadas com variação de tempo.

REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEITE

Leite pode ser considerado uma secreção ou fluído proveniente das glândulas mamárias de fêmeas de todas as espécies de mamíferos, possui normalmente cor branca, sabor adocicado e aroma agradável (BEZERRA et al., 2008). Mais de quatro mil espécies de mamíferos produzem leite, sendo o mesmo primordial no suprimento nutricional dos recém-nascidos. Além da nutrição o leite tem funções fisiológicas por meio de proteínas e peptídios (ANTUNES, 2003).

A composição do leite varia de acordo com cada espécie em questão, os mamíferos domesticados fornecem leite bom para consumo humano, entretanto a espécie que produz quantidades significativas no mercado atual é de origem bovina. Não menos importante porém em consumo reduzido o uso de leites provenientes de outras espécies tais como cabra, ovelha, búfala entre outros também são consumidos (ANTUNES, 2003).

Em geral o leite é composto por água, açúcares, sais minerais, gorduras e vitaminas. A influência desses compostos no organismo humano pode trazer inúmeros benefícios a proteína do leite por sua vez, age como reparador de tecido muscular e também dando aquela cor esbranquiçada ao leite; Já a gordura e os açúcares são fontes de energia para o organismo; os sais minerais presentes no leite em especial o cálcio são de extrema importância na formação dos ossos e dentes (BEZERRA et al., 2008).

O leite consumido pelo homem deve estar em dentro dos padrões exigidos pela legislação, e cuidados com a manipulação devem ser de suma importância pois boas práticas de higiene previnem a contaminação do leite por microrganismos ruins. Para o leite de origem bovina a Portaria CVS/ N°06 de Vigilância Sanitária, estabelecido para comercialização de laticínios o leite precisa atender a exigências como:

“ Art. 105 - Todo leite dado a consumo humano deverá ser pasteurizado ou submetido a processo legalmente permitido, de modo a torná-lo isento de germes patogênicos, sem prejuízo de suas propriedades físicas e químicas, de seus elemento bioquímicos e de seus caracteres organolépticos normais.” (MADEIRA, FERRÃO, 2002)

3.2 LEITE FERMENTADO

Sua origem histórica não é bem definida, entretanto como outros produtos fermentados sua descoberta foi consequência da deterioração, por falta de conhecimento sobre métodos de conservação de alimentos e segundo (PEIXOTO, 2002).

“Os leites fermentados são alterados pela ação de microrganismos produtores de ácido, principalmente de ácido láctico, que encontram nele um adequado meio de desenvolvimento. Em razão disso, os leites fermentados se conservam por mais tempo do que o natural, apresentam características organolépticas atrativas e sua ingestão não ocasiona riscos a saúde, por esse motivo são consumidos regularmente. E seu uso generalizou-se em meio á mística relacionada com a elixir da longa vida ou com a fonte de juventude.”

E segundo o Regulamento Técnico (BRASIL, 2005) de Identidade e Qualidade Bebida Láctea é definida como:

“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) ou substância(s) alimentícia(s), 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.”

Como citado acima bebidas lácteas fermentadas devem conter no mínimo 51% de base láctea em sua formulação. E a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, e esse valor deve ser encontrado durante todo seu prazo de validade (BRASIL, 2005).

São produtos resultantes da fermentação do leite por fermentos lácticos. E esses fermentos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto atendendo seu prazo de validade. As determinações físico-químicas realizadas para determinação da qualidade do produto são: pH, acidez em ácido láctico, sólidos voláteis, sólidos totais, resíduos por incineração (cinzas), gordura, protídios, açucares redutores em lactose, açucares redutores em sacarose (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.3 BACTÉRIAS LÁCTICAS

As bactérias lácticas ou também bactérias do ácido láctico, são conhecidas como uma das mais importantes para a vida do homem, isso se deve ao fato da mesma ser utilizada na produção e preservação de alimentos (FERREIRA, 2012).

Quase um século após a primeira publicação do cientista Metchnikoff que relaciona os benefícios proporcionados pelas bactérias lácticas, esse tema ainda é bastante explorado, e visto com potencial muito grande para inovação. Nas últimas décadas houve uma grande mudança nas tecnologias e nas formas de explorá-las dentro do ramo da saúde existem inúmeras inovações que podem garantir ao ser humano uma vida mais saudável e melhor. Dentro disso a evolução dos conhecimentos na área microbiológica vem crescendo exponencialmente e os benefícios encontrados em bactérias lácticas vem sendo notáveis, os benefícios fornecidos ao intestino justificam o aparecimento de produtos alimentícios probióticos que utilizam as bactérias lácticas como fermentação. Caracterizados como alimentos funcionais (FERREIRA, 2012).

Os alimentos funcionais além de nutrir exercem um papel específico em nosso organismo regulando o funcionamento intestinal e aumentando a imunidade do organismo (FERREIRA, 2012).

Bactérias lácticas fazem parte de um gênero microbiano que apresenta alguns fenótipos em comum tais como são bactérias gram-positivas, são asporogênicas e o ácido láctico é acumulado no meio como produto do metabolismo primário. Bactérias do ácido láctico quando em contato com o intestino humano ou animal constituem atualmente um grupo conhecido por bactérias probióticas, as quais, quando consumidas em quantidades adequadas, oferecem inúmeros benefícios ao hospedeiro (FERREIRA, 2012).

A principal função das bactérias lácticas nos alimentos é a acidificação dos produtos alimentares em um pH próximo de 4, que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos. Isso permite que o período de conservação dos produtos fermentados seja muito maior que a dos produtos onde a matéria-prima não seja fermentada. As bactérias lácteas também desenvolvem características sensoriais específicas nos alimentos fermentados,

modificando pouco a pouco sabor, textura, e aroma desses alimentos (PIARD et al., 2011).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, pertencem ao grupo de bactérias ácido-lácticas mais estudados, devido à sua predominância na microbiota intestinal. Quando são bem administrados, observou-se que os mesmos indicam uma taxa de sobrevivência de cerca de 20% a 40% à passagem pelo trato gastrointestinal, desta maneira os efeitos benéficos podem ser associados de forma imediata, e assim o alimento que contém em sua composição essas bactérias pode oferecer ao ser humano um melhoramento nas funções intestinais (FERREIRA, 2012).

3.4 PROBIÓTICOS

“Os probióticos são considerados alimentos funcionais e definidos como microrganismos vivos, que quando presentes em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro.” (FERREIRA, 2012, p. 109)

Atualmente uma boa alimentação segue parâmetros estabelecidos pela ciência, e a algum tempo a exigência por alimentos funcionais tem sido manifestada pelos consumidores. Esses alimentos possuem componentes biologicamente ativos, ou seja, quando consumidos como parte da dieta frequente, são capazes de produzir benefícios fisiológicos com potencialidade de reduzir o risco de doenças crônicas. Além disto os alimentos funcionais podem também ser considerados aqueles alimentos com composição nutricional balanceada e que ofereçam benefícios à saúde (FERREIRA, 2012).

Os primeiros estudos envolvendo probióticos começaram há mais de um século, com o microbiologista Russo Ellie Metchnikoff, e suas observações relacionadas a benefícios para a saúde humana conferidos pelos leites fermentados no antagonismo à microbiota indesejável nos intestinos (FERREIRA, 2012).

Logo depois estudos em animais *germ-free* (livres de microrganismos) evidenciaram as suas hipóteses, e demonstraram que os microrganismos intestinais produzem substâncias que comprometem a saúde humana, podendo favorecer ou não a ocorrência de determinados grupos bacterianos (FERREIRA, 2012).

3.5 GÊNERO LACTOBACILLUS

“A justificativa do uso de *Lactobacillus* é devido ao fato de que os mesmos colonizam a microbiota do organismo humano após o nascimento, em grande quantidade, e quando ocorre o aumento da sua concentração, ocorre o decréscimo da concentração de outros microrganismos patogênicos ou deteriorantes” (MENDES, 2011).

No início dos estudos relacionados a bactérias lácticas a observação principal era as características responsáveis pela capacidade de fermentação e coagulação do leite fornecida por este conjunto de microrganismos, o que incluía também o grupo coliformes. A descrição de *Lactobacillus* veio por meio de Beijerinck em 1901 como bactérias Gram-positivas, o que pode separar a categoria de coliformes das bactérias lácticas (BURITI; SAAD, 2007).

Atualmente estudos comprovam que os microrganismos tipicamente presentes no hospedeiro humano, são das espécies tais como: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae*. Todas essas espécies apresentam características muito similares umas das outras, uma delas pode ser destacada é que as mesmas multiplicam-se em condições ambientais parecidas (BURITI; SAAD, 2007).

Essa bactérias consideradas benéficas ao ser humano possuem atividade antimicrobiana contra microrganismos patógenos, contaminantes e deteriorantes em alimentos. Pode ser destacado o probiótico *Lactobacillus casei* Shirota que vem se mostrando um ingrediente extremamente ativo, chegando ao intestino em grande quantidade e proporcionando uma confiabilidade nos produtos os quais o microrganismo é utilizado (BURITI; SAAD, 2007).

3.6 ETAPAS DE PRODUÇÃO COMERCIAL DO LEITE FERMENTADO

As etapas descritas abaixo são fornecidas por um dos fabricantes de leite fermentado disponível no mercado nacional. Desta forma, podemos considera-lo como sendo de forma geral o procedimento que envolve a fabricação de tal produto (YAKULT S/A INDÚSTRIA E COMÉRCIO, 2011).

Inicialmente é realizada a preparação do leite, onde o leite desnatado é esterilizado e segue para os tanques de pré-fermentação e de fermentação.

Em seguida ocorre o processo de fermentação no tanque de pré-fermentação, onde o leite esterilizado recebe a cultura de *Lactobacillus*.

Após o período de pré-fermentação, o líquido é transferido ao tanque de fermentação. A fermentação é a etapa mais importante da fabricação do leite fermentado, pois dela depende o perfeito desenvolvimento dos lactobacilos probióticos.

Após o termino da fermentação, o leite fermentado passa pelo tanque de equilíbrio e depois pelo homogeneizador. O leite homogeneizado segue então para o tanque de mistura.

Na próxima etapa tem-se a preparação do “xarope” inicialmente realizada a esterilização do mesmo onde o açúcar é dissolvido em água e segue para o tanque de dissolução. O xarope esterilizado fica armazenado no tanque de estocagem até ser enviado para o tanque de mistura.

No tanque de mistura, a essência é adicionada ao leite fermentado e ao xarope para conferir o aroma e o sabor característico do Leite Fermentado. O leite fermentado é resfriado e está pronto para ser engarrafado.

Os frascos são fabricados com um tipo especial de matéria-prima próprio para a indústria de alimentos que é derretido e, em seguida, injetado nos moldes. Os moldes recebem sopro de ar comprimido para obter o formato. Os frascos prontos seguem para os Silos de Estocagem de Frascos. O engarrafamento acontece, quando os frascos são envasados com o Leite Fermentado, recebem a tampa e são selados. Depois, passam pela Datadora e recebem as datas de fabricação e de validade.

O empacotamento acontece quando os frascos de Leite Fermentado são conduzidos por meio de esteiras para as embaladoras automáticas, onde são formados minipacotes com 4 ou 6 unidades. Então, os minipacotes são embalados novamente em pacotes com 40 ou 60 unidades e esses são empilhados sobre paletes.

Os paletes seguem para a Câmara-Refrigerada e são dispostos automaticamente em prateleiras. Após liberação do Laboratório de Controle de

Qualidade, o Leite Fermentado sai da fábrica em caminhões refrigerados para os pontos de comercialização e, finalmente, aos consumidores.

3.7 CRITÉRIOS FÍSICO-QUÍMICO PREVISTO PARA LEITE FERMENTADO

A tabela 1 é referente aos valores das análises físico-químicas disponibilizadas pela legislação no Brasil.

Tabela 1 – Critérios físico-químicos estabelecidos pela legislação brasileira, para leite fermentado.

Análise	Valor Padrão g/100g	Referência
<i>Proteína</i>	Min. 2,9	MAPA, normativa nº 46 a 23/outubro/2007
<i>Acidez</i>	0,6 a 2,0	MAPA, normativa nº 46 a 26/outubro/ 2007
<i>Lipídios</i>	<i>Com creme:</i> mín. 6,0 <i>Integrais ou Enteros:</i> mín. 3,0. <i>Parcialmente desnatados:</i> máx. 2,9 <i>Desnatados:</i> máx. 0,5	MAPA, normativa nº 46 a 26/outubro/2007

Fonte: Brasil (2007).

Em função disto a tabela 2 mostra trabalhos científicos com leites fermentados e seus resultados de viabilidade para termos como referência uma vez que muitas análises não são preconizadas pela legislação brasileira (BRASIL, 2007).

Tabela 2 – Critérios físico-químicos para leite fermentado estabelecidos por trabalhos científicos semelhantes ao realizado.

Análise	Valor estabelecido	Referência
<i>pH</i>	4,21 á 4,42	GALLINA et al. (2011)
	4,14 á 4,68	MENDES (2011)
<i>Sólidos Totais</i>	18,08 á 19,44%	CUNHA et al. (2008)
	12,3 á 22,5%	OLIVEIRA; DAMIN (2003)
<i>Cinzas</i>	0,65 á 0,60%	CUNHA et al. (2008)
	0,53 á 0,61%	THAMER; PENNA (2006)
<i>Umidade</i>	81,84 á 83,90%	MENDES (2011)
	75,43 á 78,62%	SANTOS et al. (2008)
<i>Açúcares Redutores</i>	7,54 á 10,57%	SANTOS et all. (2008)
	12,93 á 16,27%	THAMER; PENNA (2006)
<i>Açúcares não Redutores</i>	(8,07 á 10,90%)	SANTOS et al. (2008)

3.8 CRITÉRIO MICROBIOLÓGICO PREVISTO PARA LEITE FERMENTADO

Segundo a Legislação nacional os parâmetros microbiológicos estabelecidos para leite fermentado estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros microbiológicos para leite fermentado.

Parâmetros analisados	Legislação brasileira
Coliformes totais (35°C)	10 NMP/g
Termotolerantes (45°C)	10 NMP/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausente em 25 g

Fonte: BRASIL (2007).

A legislação nacional prevê que o leite fermentado dever conter em sua composição até o último dia de validade as características microbiológicas referentes à quantidade de bactérias lácticas tal como descrita na tabela 4.

Tabela 4 – Contagem de microrganismos específico para a inspeção de leites fermentados no Brasil.

Produto	Contagem de bactérias lácticas totais (UFC/mL)	Contagem de levedura específica (UFC/mL)
Leite fermentado	Min. 10 ⁶	-

Fonte: Brasil (2007)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA LEITE FERMENTADO

As análise referentes a todos os métodos descritos abaixo foram realizadas no laboratório LAQUA – na Universidade Tecnológica Federal do Paraná. No período de fevereiro de 2014. As determinações aconteceram no dia em que realizou-se a compra dos leites fermentados e após 21 dias de estocagem sob devida refrigeração.

4.1.1 Determinação do teor proteína

A análise de teor de proteína seguiu o método de Titulometria (Kjeldhal) segundo a Instrução Normativa nº 68/2006 do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento porém com alterações (BRASIL, 2006).

Nitrogênio total

Para a digestão, foram pesados 0,2 g da amostra, como a mesma é líquida foram pesadas as gotas, dentro de um balão de Kjeldahl. E adicionado cerca de 0,7 g de mistura catalítica, e acrescentou-se 2 mL de ácido sulfúrico P.A. e 1 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi então aquecida em um bloco digestor, em temperatura crescente até a emissão de vapores brancos (335°C).

Após três a quatro horas de digestão esperou-se que toda a matéria orgânica fosse digerida, formando o sulfato de amônio. Ao final desta etapa visualizou-se o momento em que o líquido tornou-se límpido, e na sua tonalidade permanecendo azul-esverdeado. Neste momento retirou-se os tubos do bloco digestor, nos quais

após ser resfriados adicionaram-se 10 mL de água para dar início a segunda etapa que é a destilação.

Para a destilação, conectou-se o frasco no destilador de micro Kjeldhal adicionou-se aproximadamente 20 mL da solução de hidróxido de sódio a 40% até que a mesma torne-se negra, a amostra foi destilada com velocidade de 6 a 10 mL por minuto. Coletou-se 50 mL do destilado em erlenmeyer de 100 mL que deve conter 10 mL da solução de ácido bórico e 4 a 5 gotas de solução de indicador misto.

Para a titulação utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico 0,1N até a viragem do indicador para a cor rosa. A porcentagem de proteínas foi determinada em função da porcentagem de nitrogênio total x fator de conversão da relação nitrogênio/proteína (BRASIL, 2006).

Cálculo

$$\% \text{ de proteína} = \frac{(A-B) \times f \times 0,1 \times 0,014 \times 6,25 \times 100}{\text{peso da amostra}} \quad (\text{Eq. 1})$$

A = volume gasto em mL do titulante para titular a amostra.

B = volume gasto em mL do titulante para titular o branco.

f = fator de correção do ácido sulfúrico 0,1N.

fator de correção: 6,38

4.1.2 Determinação de acidez (° Dornic)

A análise de acidez por Titulometria seguiu a Normativa nº 68/2006 do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento segundo (BRASIL, 2006).

A determinação da acidez pelo processo Dornic é utilizada quando se necessita conhecer a acidez com exatidão, para isso realizou-se uma titulação com hidróxido de sódio N/9 ou 0,11N designada de soda Dornic. Essa determinação da acidez por titulometria fundamenta-se na neutralização das funções ácidas do leite, até o ponto de equivalência, por meio de uma solução de hidróxido de sódio com concentração conhecida e juntamente com um indicador, a fenolftaleína (TRONCO, 2008).

A técnica para essa determinação iniciou-se com adição de 10 mL da amostra em um béquer, em seguida adicionou-se 4 a 5 gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se com a solução Dornic (NaOH 0,11N) até atingir uma coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos (BRASIL, 2006).

Para determinação da acidez em ácido láctico fez-se a conversão da acidez em graus Dornic (°D) através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ ácido láctico} = \text{°D} / 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

4.1.3 Determinação do pH

A análise de pH seguiu o método potenciométrico segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

A determinação dos valores de pH fundamentou-se na medida da concentração dos íons hidrogênio presentes na amostras a ser analisada. O pHmetro utilizado é do modelo W3b, devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.1.4 Determinação sólidos totais

A análise de Sólidos Totais seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

Para a determinação dos sólidos totais, primeiramente foi aferido o valor de uma cápsula de porcelana de 150 mL, previamente aquecida em mufla á 550°C e posteriormente resfriada em dessecador. Foi transferido 100 mL da amostra para a cápsula e evaporado em banho maria até a secura. Em seguida o conjunto foi aquecido em estufa a 105°C por 2 horas, e resfriado em dessecador. Posteriormente pesado a cápsula com o resíduo em balança analítica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Cálculo

$$\text{Sólidos Totais (mg/L)} = \frac{(P_2 - P_1) \times 1.000.000}{V} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

P_1 = Peso cápsula vazia.

P_2 = Peso cápsula mais resíduo após ignição.

V = Volume da amostra em mL.

4.1.5 Determinação sólidos fixos

A análise de Sólidos Fixos seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

Para essa determinação foi necessário utilizar a cápsula com resíduo anteriormente obtidos nos sólidos totais, o procedimento foi determinado com calcinação do conjunto em mufla a 550°C por 1 hora. Posteriormente resfriado em dessecador e pesado a cápsula mais resíduo em balança analítica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Cálculo

$$\text{Sólidos Totais (mg/L)} = \frac{(P_2 - P_1) \times 1.000.000}{V} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

P_1 = Peso cápsula vazia.

P_2 = Peso cápsula mais resíduo após ignição.

V = Volume da amostra em mL.

4.1.6 Determinação sólidos voláteis

A análise de Sólidos voláteis seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

Para a determinação de sólidos voláteis efetuou-se a diferença dos valores entre o procedimento 4.1.4 sólidos totais e o procedimento 4.1.5 sólidos fixos, o valor encontrado implica no teor de sólidos voláteis (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.1.7 Determinação de cinzas

A análise de cinzas seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

O resíduo por incineração (cinzas) do leite em geral é constituído principalmente por óxidos de potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo e por cloretos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Primeiramente foi aferido o valor de uma cápsula de porcelana de 50 mL, previamente aquecida em mufla á 550°C e posteriormente resfriada em dessecador. Em seguida transferiu-se 20 mL de amostra para uma cápsula de porcelana, evaporar em banho maria até secagem. Carbonizou-se em chapa aquecedora e incinerou-se em mufla á 550°C pelo período de 4 horas. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Por fim resfriou-se em dessecador e foram pesadas a cápsula mais resíduo em balança analítica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Cálculo

$$\% \text{ de cinzas (m/v)} = \frac{100 \times P}{A} \quad (\text{Eq. 5})$$

P = n° de g de resíduo.

A = n° de mL da amostra.

4.1.8 Determinação do teor de lipídeos

A análise de Lipídeos seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

O método mais empregado para a determinação de lipídeos no leite é o de Gerber. O princípio que envolve a técnica é a quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, na centrifugação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O procedimento deu-se inicio ao pesar os lactobutirômetros com suas rolhas em função de verificar se os mesmos estavam com os pesos equivalentes. Em

seguida transferiu-se 10 mL de ácido sulfúrico para o butirômetro, onde foram adicionados lentamente 11 mL de amostra e 1 mL de álcool isoamílico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O butirômetro foi fechado e pesado, assim como agitado até completar a dissolução. A centrifugação ocorreu em 1200 rpm durante 15 minutos. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Foi levado á banho maria a 65°C por 3 minutos, com rolha para baixo. E realizou-se a leitura da camada clara (gordura), dentro da escala graduada do lactobutirômetro. O valor obtido na escala correspondeu diretamente à porcentagem de lipídeos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.1.9 Determinação do teor de umidade

A análise de umidade seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização quais sejam submetidos, contêm água. E a determinação de umidade pode representar a porcentagem de água que compõem esse alimento. A umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água ou outras substâncias voláteis são removidas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O procedimento para essa determinação realizou-se através da pesagem de 10 g da amostra em uma cápsula de porcelana, previamente tarada. Em seguida aqueceu-se o conjunto em estufa á 105°C durante 3 horas. E por fim resfriou-se em dessecador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Cálculo

$$\% \text{ de umidade (m/v)} = 100 \times \frac{N}{P} \quad (\text{Eq. 6})$$

N = nº de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = nº de gramas da amostra

4.1.10 Determinação de açúcares redutores em lactose

A análise de açúcares redutores em lactose seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

O procedimento para determinação de açúcares redutores em lactose realizou-se através da diluição de cerca de 2 g da amostra em um balão volumétrico de 100 mL, e adicionou-se 2ml da solução de sulfato de zinco 30 %, 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio 15% e misturou-se, em seguida deixou-se sedimentar durante 5 minutos, após isto completou-se o volume do balão com água. Filtrou-se o líquido em frasco erlenmeyer de 300 mL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Em um balão de fundo chato de 300mL adicionou-se 10 mL de cada uma das soluções de Fehling, e 40 mL de água, e aqueceu-se até ebulição. Foi transferido o filtrado para uma bureta de 25 mL , e em seguida adicionando-se às gotas , sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul para incolor e no fundo o resíduo estiver da cor vermelho tijolo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Cálculo

$$\% \text{ de lactose (m/m)} = \frac{A \times 0,068 \times 100}{V \times P} \quad (\text{Eq. 7})$$

A = n° de mL de P g da amostra

V = n° de mL da solução da amostra gasto na titulação

P = n° de g da amostra

4.1.11 Determinação de açúcares não redutores em sacarose

A análise de açúcares não redutores em sacarose seguiu as normativas segundo Instituto Adolfo Lutz – edição IV de métodos físico - químicos para alimentos.

O procedimento para determinação de açúcares não redutores em sacarose iniciou-se com a pesagem de 5g da amostra, diluiu-se a mesma em 100 mL de água

que foram passados para um erlenmeyer de 250 mL. Acidificou-se 2 mL de ácido clorídrico, e aqueceu-se em banho-maria deixando ferver durante 15 minutos e logo depois resfriou-se. A solução foi neutralizada com hidróxido de sódio a 30%, verificou-se com fita indicadora de pH. Em seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL. Foram adicionados 5mL de sulfato de zinco a 30% e 5 mL de ferrocianeto de potássio a 15% e misturou-se. Deixou-se sedimentar por 5 minutos, e completou-se com água destilada. Em seguida filtrou-se em papel de filtro para frasco de erlenmeyer de 300 mL.

Em um balão de fundo chato de 300mL adicionou-se 10 mL de cada uma das soluções de Fehling, e 40 mL de água, e aqueceu-se até ebulição. Transferiu-se o filtrado para uma bureta de 25 mL, em seguida adicionado-se às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul para incolor e no fundo o resíduo estiver da cor vermelho tijolo.

Cálculo

$$\% \text{ de sacarose (m/m)} = \frac{(A \times 0,05 \times 100 - \% \text{ de lactose})}{V \times P} \times 0,95\% \quad (\text{Eq. 8})$$

A = nº de mL de P g da amostra

V = nº de mL da solução da amostra gasto na titulação

P = nº de g da amostra

4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS PARA LEITE FERMENTADO

As análises referentes a todos os métodos descritos abaixo foram realizadas no laboratório LAQUA – na Universidade Tecnológica Federal do Paraná. No período de fevereiro de 2014. As determinações ocorreram no dia em que será realizada a compra dos leites fermentados e após 21 dias de estocagem sob devida refrigeração. Com ressalva para a contagem de bactérias ácido lácticas pois está ocorrera no dia da compra, no decimo quarto, décimo sexto, vigésimo primeiro, vigésimo terceiro, vigésimo oitavo e trigésimo dia de estocagem.

O objetivo dessas análises segundo a legislação é determinar a enumeração (NMP) de coliformes totais, coliformes termotolerantes, e isolamento de *Salmonella*

spp. por ser considerado um microrganismo de importância em saúde pública por causar infecções alimentares, e tida como importante Doença transmitida por alimentos (DTA).

Além dessas foram realizadas análises de viabilidade e de comportamento microbiano das bactérias ácido láctica presente no leite fermentado, sendo possível a determinação das características da mesma e se essas são preservadas após determinado período de tempo de prateleira.

Ressaltando que todas as embalagens utilizadas para a realização das análises foram previamente esterilizadas em autoclave por vapor úmido.

4.2.1 Coliformes totais

A análise de Coliformes Totais seguiu o teste presuntivo e confirmativo segundo a Instrução Normativa nº 62/2003 do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Inicialmente realizou-se as diluições necessárias, com 25 mL de amostra, os quais foram diluídos em 225 mL de solução água peptonada 0,1% originando a diluição 10^{-1} , e em seguida realizadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Isso para as três marcas de leite fermentado.

Para o teste presuntivo adicionou-se 1 mL de cada diluição em três séries de três tubos contendo 10 mL do meio LST (Lauril Sulfato Triptose) e um tubo de Durhan invertido em cada um deles. Estes tubos foram incubados a 35°C por 48 horas.

Sendo considerado teste positivo para os tubos que apresentaram gás no interior do tubo de Durhan, como resultado da fermentação de lactose produzindo ácido e gás. O meio LST possui o sal Lauril Sulfato de Sódio que é seletivo a coliformes.

Para a realização do teste confirmativo retirou-se uma alíquota com auxílio de uma haste de níquel-cromo de cada tubo de LST com sub-cultivo crescido, e colocado em tubos contendo 10 mL de Caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL) e um tubo de Durhan invertido para confirmar a presença de coliformes totais, incubados novamente em estufa a 35°C por 48 horas. O caldo VBBL possui a

lactose que é usada como fonte de carbono pelos coliformes e o verde brilhante e os sais biliares são inibidores da microbiota Gram positiva.

O resultado do teste é evidenciado pelo comportamento da bactéria que ao crescer fermenta a lactose produzindo gás, que fica aprisionado do interior do tubo de Durhan, o que caracterizará positivo. Consultou-se a tabela de número mais provável para obter o número de coliformes totais presente na amostra.

4.2.2 Coliformes termotolerantes

A análise de Coliformes termotolerantes seguiu teste presuntivo e confirmativo segundo a Instrução Normativa nº 62/2003 do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Para confirmação da presença de coliformes termotolerantes realizou-se o mesmo procedimento descrito para os coliformes totais, porém os sub-cultivos dos tubos positivos, do teste presuntivo serão inoculados em tubos contendo Caldo EC que é seletivo para *Escherichia coli* pela técnica de número mais provável, e incubados em banho – maria á temperatura de 44,5°C por 48 horas.

4.2.3 Isolamento de *Salmonella spp.*

A análise de *Salmonella ssp.* seguiu o teste tivo segundo a Instrução Normativa nº 62/2003 do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Inicialmente realizou-se o pré - enriquecimento ou enriquecimento não seletivo, nesta etapa recupera-se as células injuriadas, restabelecendo as condições fisiológicas ideais do microrganismo, para que ocorra crescimento e multiplicação bacteriana.

A análise iniciou-se com a transferência de 25 mL de amostra de leite para um frasco contendo 225 mL do meio de cultura Água Peptonada Tamponada (APT) com incubação a 35°C por 24 horas em estufa.

A segunda etapa é o enriquecimento seletivo, onde transferiu-se, 0,1 mL do sub-cultivo crescido no pré - enriquecimento seletivo para um tubo contendo 10 mL de Caldo de Rappaport Vassiliadis (RV), e também 1,0 mL do sub-cultivo em caldo

Tetracionato, ambos foram incubados em banho-maria a temperatura de 42°C por 24 horas

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento foram repicados sobre a superfície de placas de Petri contendo meio ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) incubadas a 35°C durante 24 horas. Após isso verificou-se se ocorreu crescimento de colônias e determinou-se a presença ou não de *Salmonella spp* através de testes bioquímicos e sorológicos.

4.2.4 Avaliação da viabilidade celular da cultura láctea do leite fermentado

A análise de viabilidade celular da cultura láctea do leite fermentado seguiu o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA; et all, 2007).

A viabilidade celular das bactérias lácticas foram determinadas pela contagem total de células viáveis em placas de Petri. Inicialmente foram realizadas diferentes diluições da amostra em água peptonada 0,1% (m/v).

Selecionou-se três diluições adequadas e inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis e vazias, adicionando-se, em seguida o meio mais adequado para o crescimento dessas bactérias que neste caso é o meio agar - Man, Rogosa e Sharpe (MRS), em seguida realizou-se a técnica utilizada para inoculação chamada de Pour Plate, que consiste em despejar o meio sob as amostras diluídas e realizar movimentos em 8 (oito) visando uma melhor homogeneização da placa, colocou-se sobre a mesma mais uma sobrecamada de meio de cultura para garantir a perfeita anaerobiose.

Em seguida as placas de Petri preenchidas foram colocadas invertidas dentro de jarros de anaerobiose para que ocorresse a incubação. Os jarros de anaerobiose tem como finalidade preservar a atmosfera de crescimento microbiano ausente de oxigenação. Para a obtenção da atmosfera anaeróbia foram utilizados Anaerobacs, no interior dos jarros. Os jarros foram colocados em estufa a 37°C por um período de 48 horas, para melhor crescimento microbiano.

A confirmação do crescimento das colônias foi realizada através da contagem das bactérias lácticas encontradas nas placas de Petri após o tempo estipulado pelo manual, essa contagem foi expressa em UFC/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes as análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nos leites fermentados disponibilizados em supermercados da região sudoeste do Paraná, estão apresentados na Tabela 5.

Todas as verificações foram realizadas em diferentes períodos de tempo, pois os leites fermentados encontrados nos supermercados do município desta região do Paraná chegam com aproximadamente 14 á 16 dias de fabricação. Isso se deve, pelo fato da cidade não estar próxima a uma grande fábrica produtora de leite fermentado logo como o fato da indústria responsável por tal produto exigir uma permanencia de em média 5 dias dos leites em sua fábrica, para a realização de análises referentes ao controle de qualidade.

Por causa de tais especificações os lotes da marca A puderam ser comprado no tempo de 14 dias após a sua fabricação e os leites fermentados da marca B e C somente após 16 dias de fabricação.

As análises físico-químicas realizadas nesta pesquisa foram feitas no dia da compra e no dia do término da validade indicada por cada produto.

A avaliação do teor de bactérias lácticas viáveis nos leites fermentados foi realizado nos tempos de 14, 16, 21, 23, 28 e 30 dias de estocagem. As análises de coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella spp* foram realizadas no dia da compra no supermercado.

Tabela 5 – Análises físico-químicas realizadas em diferentes marcas de leite fermentado.

Análises	15 dias de armazenamento			30 dias de armazenamento			Legislação* (g/100g)	Rotulo (g/100g)
	A	B	C	A	B	C		
Proteína (g)	1,93±0,01 ^{Aax}	1,22±0,01 ^{Aby}	1,03±0,02 ^{Acy}	2,43±0,03 ^{Bax}	1,38±0,02 ^{Bcy}	1,64±0,04 ^{Bby}	Min. 2,9	2,2
Acidez / g	0,996±0,01 ^{Abz}	1,24±0,02 ^{Aax}	1,03±0,03 ^{Aby}	1,02±0,02 ^{Abz}	1,27±0,01 ^{Aax}	1,18±0,09 ^{Bay}	0,6 á 2,0	
pH**	3,84 ^A	3,65 ^A	3,98 ^A	3,83 ^B	3,60 ^B	3,84 ^B	-	-
Sólidos totais (%)	15,34±0,05 ^{Aby}	14,19±0,01 ^{Acz}	17,19±0,01 ^{Aax}	16,69±0,08 ^{Bby}	14,99±0,10 ^{Bcz}	18,96±0,13 ^{Bax}	-	-
Sólidos Fixos (%)	3,48±0,22 ^{Acy}	5,37±0,07 ^{Aax}	4,62±0,13 ^{Abxy}	2,82±0,15 ^{Bay}	3,12±0,24 ^{Bax}	3,23±0,79 ^{Baxy}	-	-
Sólidos Voláteis (%)	11,86±1,38 ^{Aabx}	8,82±0,88 ^{Aby}	12,57±0,46 ^{Aax}	13,87±1,77 ^{Aax}	11,87±0,61 ^{Bay}	15,73±0,82 ^{Bax}	-	-
Cinzas (%)	3,23±1,02 ^{Aax}	5,28±1,23 ^{Aax}	4,59±1,03 ^{Aax}	2,75±0,94 ^{Aax}	2,98±0,75 ^{Bax}	3,10±0,25 ^{Bax}	-	-
Lipídios (%)	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0	mín 3,0	Nd
Umidade (%)	84,73±0,69 ^{Aay}	85,93±0,04 ^{Aax}	82,96±0,11 ^{Abz}	83,51±0,47 ^{Bby}	85,05±0,14 ^{Bax}	81,09±0,18 ^{Bcz}	-	-
Açúcares redutores (%)	27,59±0,39 ^{Aax}	27,58±0,32 ^{Aax}	26,29±0,24 ^{Aby}	26,65±0,18 ^{Aax}	26,40±0,30 ^{Bax}	25,37±0,46 ^{Aby}	-	13,75 á 16,25
Açúcares não redutores (%)	13,07±0,25 ^{Abx}	14,97±0,51 ^{Aax}	9,05±0,19 ^{Acy}	9,07±0,17 ^{Bax}	7,92±0,20 ^{Bbx}	1,53±0,20 ^{Bcy}	-	13,75 á 16,25

* BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007.

Média ± Desvio padrão.

**Excepcionalmente para a análise de pH realizou-se o teste t para entre conjunto das amostras nos intervalos de tempo de 15° e 30° dia.

^{A, B} Letras maiúsculas iguais na mesma linha analisado entre amostras da mesma marca, não possuem diferença significativa pelo teste t (p<0,05)

^{a, b, c} Letras minúsculas iguais na mesma linha analisado entre amostras de marcas diferentes e mesmo tempo de armazenagem, não possuem diferença significativa pelo teste Tukey (p<0,05)

^{x, y e z} Letras iguais na mesma linha analisada entre todas as amostras da tabela e em todos os períodos de armazenamento não possuem diferença significativa pelo teste Tukey (p<0,05).

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.1 Proteína

Dados da Tabela 5 apontam que o teste t demonstrou diferença significativa nos valores de proteína para todas as marcas, quando avaliadas entre si, ou seja, marca A com relação a marca A, durante o período de armazenagem.

Quando realizado o teste de Tukey para o 15° dia de armazenagem observou-se que os valores de proteína das marcas A, B e C apresentaram diferença significativa entre si. Para o 30° dia de armazenagem os valores de proteína também diferiram entre as marcas avaliadas.

Quando aplicado o teste Tukey ($p < 0,05$) para todas as marcas durante todo o período de realização da pesquisa verificou-se que as marcas B e C não apresentaram diferenças significativas entre si com relação ao teor de proteína, porém a marca A apresentou diferenças estatística nesta análise.

Com base nos requisitos estabelecidos pela legislação brasileira na *Instrução Normativa N°46*, segundo (Brasil, 2007), a qual determina que a proteína para leite fermentado deva ser de no mínimo 2,9 g/100g de produto. As três marcas de leites fermentados analisados estão pouco abaixo da legislação em todos os tempos de análise, durante os 16 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C.

Em Cunha et al. (2008) também foram encontrados valores de proteínas em torno de (2,23 á 2,80%) que estão próximas as avaliadas nessa pesquisa, onde os teores de proteína verificados na elaboração de bebida láctea e leites fermentados acrescidos de próbióticos, obtidos a partir do leite e do soro de queijo também apresentam diferença significativa entre si.

5.1.2 pH e acidez

Segundo os dados disponibilizados na tabela 5, quando realizado o teste *t* para os valores de pH, estes diferem estatisticamente com o passar do tempo. Ou seja, os valores encontrados no período de 15° dia de armazenagem são diferentes dos valores encontrados ao 30° dia de armazenamento.

Não foi possível discutir os resultados de pH com base na legislação brasileira, pois a *Instrução Normativa Nº46*, para leites fermentados não estabelece parâmetros para essa análise. Porém tal avaliação também foi realizada em trabalho semelhante por Gallina et al. (2011), que caracterizou diferentes leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos, onde também houve um decréscimo do valor de pH ao longo do armazenamento refrigerado dos leites fermentados, tal observação foi atribuída à contínua produção de ácidos pelas bactérias lácticas.

Segundo Mendes (2011) quando analisou os valores pH entre dois leites fermentados produzidos a partir de culturas com *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* verificou que o pH dos leites fermentados sofreram um declínio, devido a maior produção de ácido láctico pelos microrganismos adicionados no leite.

Com base no conceito de que as bactérias lácticas presentes em todos os leites fermentados continuam sua produção de ácido ao longo da sua vida de prateleira, pode-se afirmar que os valores verificados nesta pesquisa estão coerentes.

A análise estatística (teste *t*) para os valores de acidez em todas as amostras de leite fermentado analisados neste estudo mostrou que as marcas A e B não diferiram estatisticamente quando avaliadas em relação elas mesmas em diferentes tempos, porém os valores de acidez encontrados para marca C diferiram significativamente entre esta mesma marca (Tabela 5).

Com relação a acidez dos produtos, no 15º dia de armazenamento as marcas A e C não diferiram estatisticamente entre si, porém a marca B diferiu das demais para esse período. Após 30º dia de armazenamento verificou-se que as marcas B e C não apresentaram diferença entre si, mas a marca A diferiu das demais nesta avaliação (Tabela 5).

Pelo teste de Tukey foi possível relacionar os valores das análises entre todas as marcas de leite fermentado e em todo seu período de armazenamento estabelecido na pesquisa. Desta forma, pode ser verificado que as marcas A, B e C aos 15 dias de armazenamento apresentaram diferenças significativas nos valores de acidez (Tabela 5).

A Tabela 5 apresenta os resultados de acidez titulável, para as três diferentes marcas de leite fermentado no período de 15º e 30º dias de armazenamento sob

refrigeração entre 8 e 10°C. Os valores encontrados para análise de acidez estão de acordo com o preconizado na *Instrução Normativa Nº46*, de leites fermentados (Brasil, 2007), o qual estabelece que os limites máximo e mínimo estejam entre 0,6 e 2,0 g de ácido láctico por 100 g de produto.

O comportamento da acidez esteve dentro do esperado, ou seja, com o passar dos dias, esses valores aumentam, pois mesmo após o término da coagulação os microrganismos os mesmos não pararam de fermentar o leite, e conseqüentemente produzir ácido láctico. Além disso, o comportamento pode ser correlacionado com o pH, pois conforme já foi ressaltado, o pH diminuiu com os dias, o que indica que o leite torna-se mais ácido com o passar do tempo.

Os resultados encontrados neste estudo vêm de encontro aos resultados encontrados por Mendes (2011) que verificou um aumento na acidez titulável durante 45 dias de estocagem de leites fermentados elaborados com culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

5.1.3 Teor de Sólidos

Os valores para sólidos totais analisados pelo teste *t* apresentaram diferenças significativas quando avaliadas as marcas A, B e C.

O teste de Tukey demonstrou que tanto para a avaliação realizada no 15° dia quanto do 30° dia de armazenamento os valores referentes a sólidos totais apresentaram diferença significativa entre as avaliações (tabela 5).

Quando englobado todos os dias de análise entre todas as marcas analisadas foi observado diferenças significativas entre os valores encontrados para sólidos totais nos leites fermentados (tabela 5).

Valores parecidos aos encontrados neste estudo foram relatados em Cunha et al. (2008), em um projeto que visou a elaboração de bebida láctea e leites fermentados acrescidos de probióticos, obtidos a partir do leite e do soro de queijo, os autores encontraram valores que variaram de 18,08 á 19,44% de sólidos totais e relataram que quanto maior a quantidade de soro adicionado a bebida láctea menor a quantidade de sólidos totais encontrada nas amostras.

Oliveira e Damin (2003) relacionaram os efeitos do teor de sólidos e da concentração de sacarose na viabilidade de bactérias do iogurte e do leite

fermentado e observaram que os valores identificados por eles variaram de 12,3 á 22,5% de sólidos totais. O trabalho realizado pelos autores buscou verificar se diferentes culturas de microrganismos tais como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* entre outros que influenciavam diretamente nos teores de sólidos totais, o que a pesquisa de tais autores concluiu é que diferentes microrganismos influenciam significativamente nos teores de sólidos totais e estes valores estão muito próximos aos obtidos neste projeto (tabela 5).

As marcas de leite fermentado A, B e C apresentaram diferenças significativas para os sólidos totais e sólidos fixos quando avaliadas separadamente entre marcas iguais e em tempos de armazenamento de 15 e 30 dias analisadas também em separado. Entretanto na análise dos teores de sólidos voláteis a marca do leite fermentado A aos 15 dias diferiu significativamente em relação ao tempo de estocagem (tabela 5).

No tempo referente a 15° dias de armazenamento observou-se que as marcas A, B e C apresentam diferenças significativas nos teores de sólidos totais e sólidos fixos (tabela 5).

Para período de 30° dia de estocagem sobre a devida refrigeração verificou-se que as marcas A, B e C não apresentaram diferença significativa quando avaliadas em conjunto nos quesitos teor de sólidos fixos e voláteis (tabela 5).

A respeito da avaliação realizada em todo o período de armazenagem tal qual com todas as diferentes marcas analisadas através do teste de Tukey observa-se que ocorre diferença significativa entre os valores encontrados para sólidos totais nos leites fermentados. Em relação aos sólidos fixos e voláteis as marcas A e C não se diferem entre si, já a marca B se difere das demais.

Ao 15° dia de estocagem os leites fermentados das marcas B e C, sob devida refrigeração apresentaram teor de sólidos voláteis que diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), entretanto a marca A não diferiu estatisticamente das demais (tabela 5).

A legislação vigente no Brasil *Instrução Normativa Nº46*, não estabelece padrões para sólidos totais, sólidos fixos e voláteis em leites fermentados, impossibilitando uma comparação a essa legislação (BRASIL, 2007).

5.1.4 Cinzas

Não houve diferença significativa no teor de cinzas pelo teste *t* para o leite fermentado (marca A) quando avaliada em relação ao tempo de estocagem (15 e 30 dias), no entanto as marcas B e C diferiram estatisticamente quando avaliadas separadamente em relação ao tempo de estocagem (tabela 5).

A análise de Tukey nos mostra que no período de 15° dia e também de 30° dia de armazenamento do alimento o mesmo não possuiu diferença significativa quando referente ao seu teor de cinzas.

Quando todas as marcas são verificadas dentro de todo o período de tempo avaliado o teste de Tukey afirma que não ocorre diferença significativa entre os valores.

Segundo a legislação brasileira, não é possível discutir os resultados obtidos através da análise de cinzas, pois *Instrução Normativa Nº46* responsável pela atribuição de tais valores não estabelece parâmetros para essa análise (BRASIL, 2007).

Cunha et al. (2008) visaram a elaboração de bebida láctea e leites fermentados acrescidos de probióticos e soro de queijo e verificaram teores de cinzas que variaram de 0,65 á 0,60%. Da mesma forma Thamer e Penna (2006) encontraram teores de cinzas de 0,53 á 0,61% em leites fermentados adicionados de soro de leite em pó. Esses valores diferem dos encontrados nesta pesquisa possivelmente devido a adição de soro de queijo as amostras elaboradas.

5.1.5 Lipídios

Como observado na tabela 5 nenhuma das marcas de leite fermentado avaliadas neste estudo apresentou teor de lipídios detectados pelo método utilizado e esse resultado está de acordo com os resultados do fabricante que não detectou lipídio em seus leites fermentados.

Os valores para análise de lipídios são disponibilizados pela *Instrução Normativa Nº46*, de leites fermentados (Brasil, 2007), o qual estabelece que os limites de mínimo de 6,0 g/100g para *creme*; mínimo de 3,0 g/100g para leites

integrais ou enterros, máximo de 2,9g/100g para leite *desnatados* e máximo de 0,5g/100g para leites *parcialmente desnatados*.

Os autores Thamer e Penna (2006) estudando leites fermentados com leite desnatado encontraram valores que variaram de 0,0 á 0,10%, resultados parecidos com os encontrados nesta pesquisa. Vale a pena salientar que os fabricantes dos leites analisados nesta pesquisa não informam em seu rótulo qual tipo de leite é utilizado na fabricação dos produtos, porém quando analisado os processos gerais da fabricação de leite fermentado tal qual descrito na fundamentação teórica deste trabalho observa-se que eles utilizam leite desnatado na composição do mesmo, o que justificaria valores tão baixos de lipídios.

5.1.6 Umidade

Com base na tabela 5 verifica-se que os teores de umidade quando analisados com auxílio do teste *t* mostra que todas as marcas analisadas nesta pesquisa apresentam diferença significativa quando avaliadas entre elas mesmas.

Ao 15° dias de armazenamento dos leites fermentados as marcas A e B não apresentaram diferença significativa neste período analisado. Já a marca C diferiu estatisticamente das demais neste período de avaliação. Em 30 dias de armazenamento dos produtos verifica-se que as três marcas avaliadas possuem diferença significativa entre si (tabela 5).

Pela análise de Tukey entre todas as amostras de leites fermentados verificou-se que os leites fermentados A, B e C possuem diferença significativa entre si (tabela 5).

Segundo a legislação vigente no Brasil, não é possível argumentar os resultados obtidos através da análise de umidade, pois *Instrução Normativa Nº46* responsável pela atribuição de tais valores não estabelece parâmetros para essa análise (BRASIL, 2007).

Mendes (2011) avaliou teores de umidade entre dois leites fermentados produzidos a partir de culturas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* e verificou-se valores em torno de 81,84 á 83,90% que ficam muito próximos aos encontrados nesta pesquisa (tabela 5).

Valores parecidos á esses foram encontrados por Cunha et al. (2008), em um projeto com bebida láctea e leites fermentados acrescidos de próbióticos, obtidos a partir do leite e do soro de queijo, os valores referentes a umidade para esse trabalho variaram (80,56 á 81,91%). Teores de umidade que variam de 75,43 á 78,62% foram encontrados por Santos et al. (2008) em pesquisa que estuda a concentração de soro do leite em bebidas lácteas fermentadas com polpa de manga.

5.1.7 Açúcares redutores e não redutores

Com auxilio do teste *t*, verificou-se que o teor de açúcares redutores nos leites fermentados A e C não possuem diferença significativa entre elas mesmas quando analisadas em tempos distintos. Já a marca B apresentou diferença entre ela mesma, quando analisada por este teste (tabela 5).

Tanto para 15° dia quanto para 30° dia de armazenamento, através do teste de Tukey verificou-se que os leites A e B não possuem diferença significativa entre si. Porém a marca C difere das demais quando analisados os açúcares redutores em lactose, durante esses dois períodos de tempo (tabela 5).

Quando avaliado todo o período e todas as marcas observou-se que as marcas A e B não possuem diferença significativa entre si, já a marca C se difere das demais quanto aplicado o teste estatístico (tabela 5).

Cunha et al. (2008) estudando formulação de bebida láctea e leites fermentados acrescidos de probióticos obtidos a partir do leite e do soro de queijo verificaram que os carboidratos totais presentes nas amostras elaboradas variaram de 13,00 á 13,29% este declara que quanto maior a quantidade de leite presente nas amostras maior a quantidade de açúcares redutores em lactose. Em trabalho semelhante realizado por Thamer e Penna (2006) os quais avaliaram a viabilidade do uso de soro de leite em pó com leite em pó na fabricação de diversas formulações de leites fermentados, foi encontrado valores de açúcares redutores variando de 12,93 á 16,27% e foi concluído que a variação se deve a quantidade de soro do leite nas formulações.

Com base nos outros trabalhos científicos realizados com a mesma finalidade observa-se que os valores obtidos neste trabalho estão pouco acima dos demais

trabalhos provavelmente devido a adição de quantidades significativas de soro de leite aos leites fermentados.

Foi possível verificar uma diminuição do teor de açúcares com o passar do tempo de armazenamento, podendo ser justificado pelo fato das bactérias lácticas presentes nos leites fermentados consumirem tais açúcares (tabela 5).

Através da estatística aplicada aos açúcares não redutores observa-se que as marcas A, B e C diferem significativamente quando comparadas entre elas mesmas em um determinado intervalo de tempo (tabela 5).

O teor de açúcar não redutor analisado em 15° dia e 30° dia de armazenagem demonstrou que as marcas A, B e C possuem diferença significativa quando comparadas entre elas nesses dois períodos de tempo (tabela 5).

Pelo teste de Tukey para todas as marcas de leite fermentado em ambos tempo de armazenagem analisados verificou-se que as marcas A e B não possuem diferença significativa entre si, já a marca C se difere das demais (tabela 5).

A *Instrução Normativa Nº46* responsável pela determinação de parâmetros físico-químicos para leites fermentados não nos trás valores referentes a análise de açúcares redutores em lactose e não redutores em sacarose (BRASIL, 2007).

Para Santos et al. (2008) os açúcares redutores em lactose e açúcares não redutores em sacarose variam em torno de 7,54 á 10,57% e 8,07 á 10,90% respectivamente, em bebidas lácteas fermentadas a base de soro de queijo mussarela e polpa de manga e quando variava a concentração de leite os autores verificaram um acréscimo no teor de açúcares redutores em lactose.

5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.2.1 Coliformes totais e termotolerantes

Nas pesquisas de coliformes totais e termotolerantes para todas as diferentes marcas de leites fermentados, não foi observada a presença de gás nos tubos de Durhan invertidos em nenhum dos tubos contendo Caldo Verde Brilhante. Portanto apenas a prova presuntiva foi realizada nesta análise. Esses resultados podem garantir que houve para todos os leites fermentados as devidas condições higiênicas sanitárias durante o processo de elaboração e armazenamento dos produtos. Além

disso, esses resultados indicam ausência de coliformes totais e termotolerantes, e garantem a qualidade microbiológica dentro do exigido pelo MAPA para leites fermentados.



Fotografia 1: Análise de coliformes totais para uma marca de leite fermentado.

Fonte: A autoria Própria

5.2.2 Isolamento de *Salmonella spp.*

Na pesquisa de *Salmonella spp.* os sub-cultivos crescido no caldo de enriquecimento seletivo foram repicados para as placas de Petri contendo ágar BPLS e XLD, que foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas, nenhuma delas apresentou crescimento microbiano assim a análise foi finalizada. Esses resultados podem garantir que houve para todos os leites fermentados as devidas condições higiênicas sanitárias durante o processo de elaboração e armazenamento dos produtos. Além disso, esses resultados indicam ausência de *Salmonella spp.*, e garantem a qualidade microbiológica dentro do exigido pelo MAPA de leites fermentados.

5.2.3 Contagem de bactérias lácticas viáveis

A contagem de bactérias lácticas viáveis nos leites fermentados foi realizada após 14 dias da data de fabricação pois estes produtos chegam até a região do sudeste do Paraná neste período. A tabela 6 mostra a contagem do número de

bactérias lácticas nos leites fermentados com 14 dias a 30 dias de armazenamento refrigerado a temperatura de 8°C.

A contagem de bactérias lácticas viáveis nas três marcas de leite fermentado variou de $1,26 \times 10^{09}$ UFC a $5,33 \times 10^{13}$ UFC nos 30 dias de armazenamento (tabela 6). As amostras de leites fermentados da marca A apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 6).

A amostra A apresentou diferença significativa nos tempos de 14, 16, 21 e 30 dias, já para os dias 21 e 23 não diferiram significativamente entre si.

A marca B no período avaliado correspondente a 16, 28 e 30 dias de armazenamento, verifica-se diferença significativa entre eles, já para os dias 21 e 23 os mesmos não diferiram significativamente entre si. Para a marca de leite fermentado C verificou-se que durante todo o período de avaliação microbiológica da bactérias lácticas viáveis presentes no produto, que o mesmo apresentou diferença significativa entre todos os dias.

Quando realizado o teste de Tukey para todo o período de tempo tal como para todas as marcas observou-se que elas quando analisadas em conjunto não diferiram significativamente entre si.

A legislação brasileira a qual determina as contagens mínimas para microrganismos específicos encontrados nos leites fermentados, estipula valores de contagem de bactérias lácticas a serem cumpridas durante toda a sua vida de prateleira, ou seja, até o último dia de validade do produto. Para leites fermentados, a contagem mínima é definida, sendo ela segundo a legislação de 10^6 UFC/mL.

Todas as marcas de leite fermentado analisados neste estudo apresentaram uma diminuição no número de bactérias lácticas viáveis (Figura 1, 2 e 3), entretanto todas ficaram com a quantidade de bactérias lácticas viáveis dentro do recomendado pela legislação vigente de microrganismos viáveis, estando acima de 10^9 UFC/mL até a sua data de validade.

Ainda sobre essas contagens, o leite fermentado comercializado na região, não só está cumprindo a legislação vigente para leites fermentados como superam a mesma, garantindo assim um produto de total qualidade para o consumidor, com todos seus efeitos benéficos a saúde do ser humano sustentado.

Tabela 6: Média das contagens de bactérias lácticas viáveis em diferentes marcas de leite fermentado

Tempo / (dias) Amostras	14	16	21	23	28	30
A (UFC/mL)	5,33x10 ¹³ ±0,18 ^{Aa}	1,54 x10 ¹³ ±0,02 ^{Ba}	9,49x10 ¹² ±0,06 ^{Ca}	6,1 x10 ¹² ±0,02 ^{Da}	5,8 x10 ¹² ±0,02 ^{Da}	4,8 x10 ¹¹ ±0,05 ^{Ea}
B (UFC/mL)	-	1,25x10 ¹¹ ±0,04 ^{Aa}	8,4 x10 ¹⁰ ±0,42 ^{Ba}	7,7x10 ¹⁰ ±0,56 ^{Ba}	4,1 x10 ¹⁰ ±0,70 ^{Ca}	5,7x10 ⁰⁹ ±0,42 ^{Da}
C(UFC/mL)	-	2,02x10 ¹¹ ±0,01 ^{Aa}	1,06x10 ¹¹ ±0,02 ^{Ba}	8,07x10 ¹⁰ ±0,02 ^{Ca}	9,35x10 ⁰⁹ ±0,12 ^{Da}	1,26x10 ⁰⁹ ±0,09 ^{Ea}

* ^{A-E} Letras maiúsculas iguais na mesma linha, não possuem diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$) quando as marcas são analisadas separadamente

* ^a Letras minúsculas iguais na mesma linha não possuem diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$) quando as três marcas são analisadas em conjunto

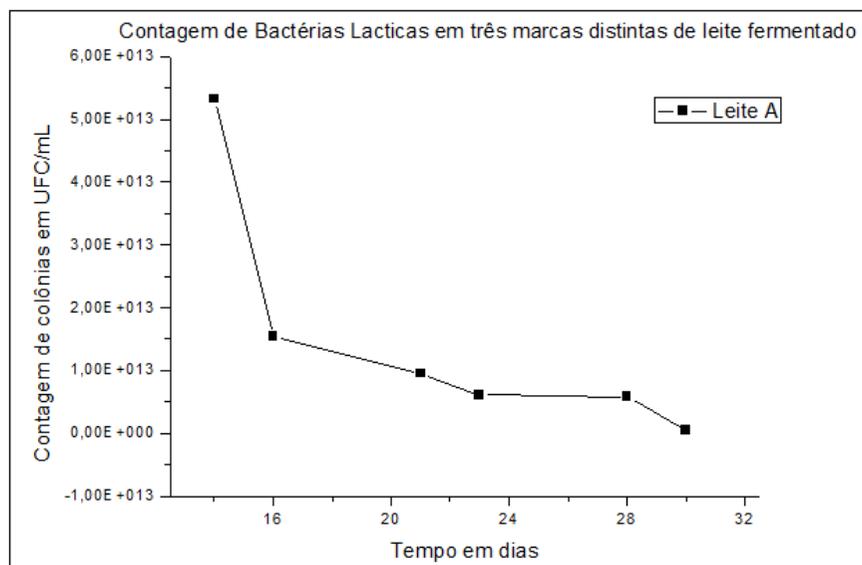


Figura 1 – Contagem microbiológica de bactérias lácticas do leite fermentado da marca A.

Fonte: Autoria própria.

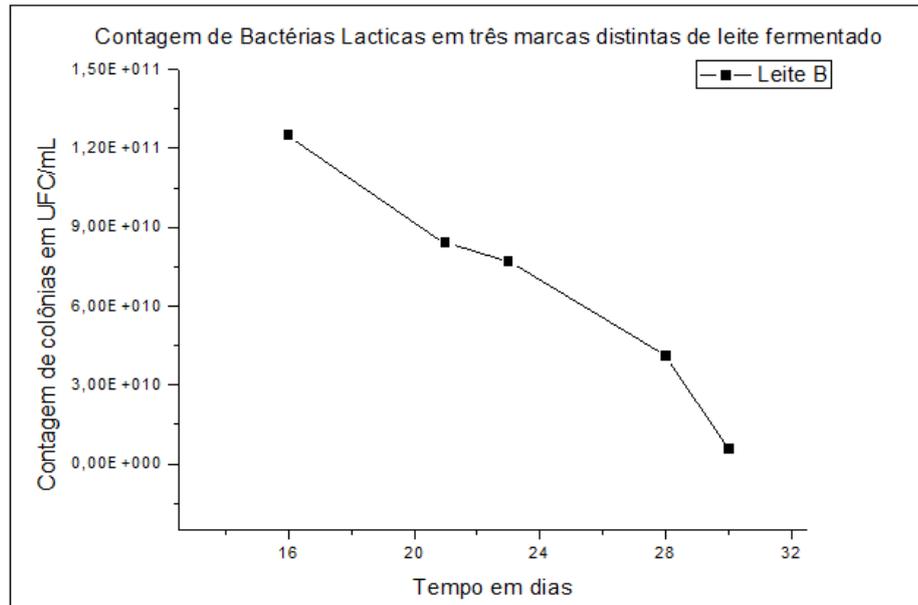


Figura 2: Contagem microbiológica de bactérias lácticas do leite fermentado da marca B.
Fonte: Autoria própria.

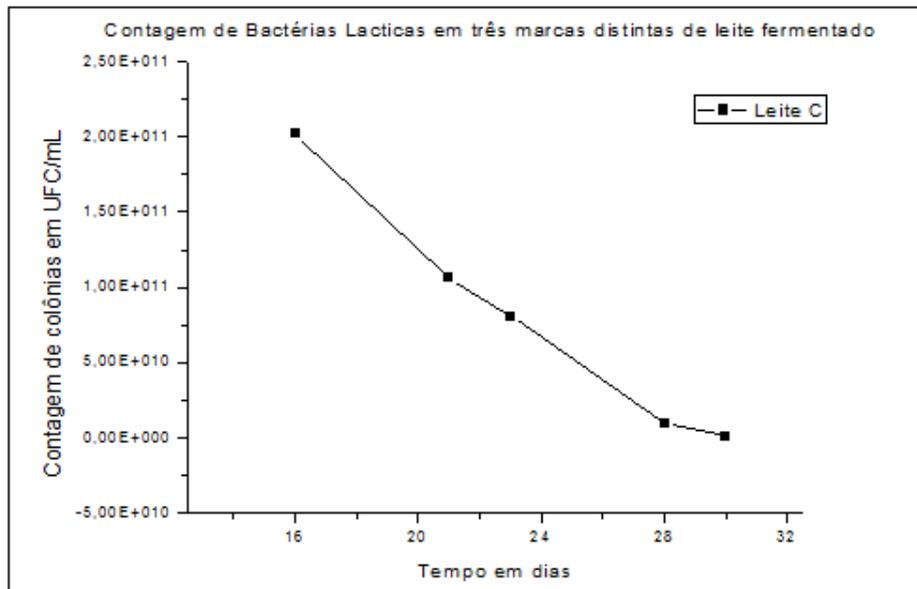
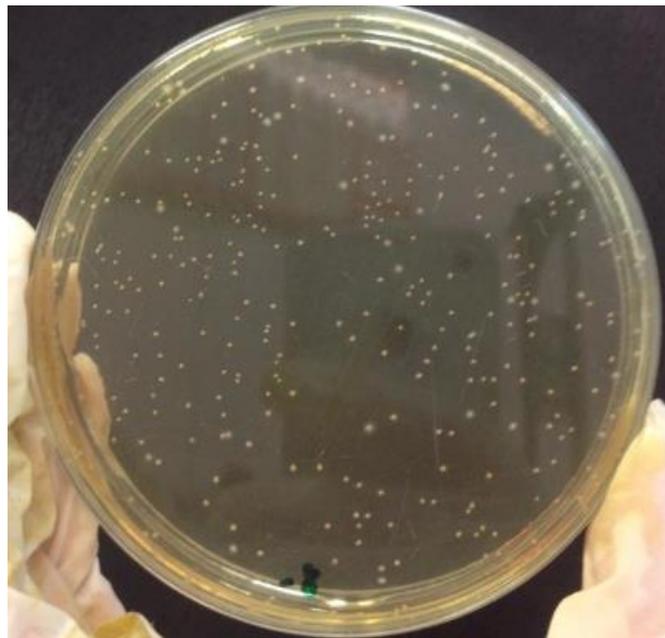


Figura 3 – Contagem microbiológica de bactérias lácticas do leite fermentado da marca C.
Fonte: Autoria própria.

Os gráficos apresentados acima, demonstram que em todas as marcas de leite fermentado analisadas neste trabalho apresentaram o mesmo comportamento gráfico, um declínio na curva de contagem de microrganismo em UFC/mL durante o seu tempo de análise.

Isso se deve ao fato das bactérias lácticas começarem a morrer, e a contagem delas passa a ser menor, porém ressaltasse que por mais que os gráficos apresentem um declínio na quantidade de bactérias viáveis presentes nos leites fermentados, os mesmo ainda possuem quantidades significativas de probióticos ao final de sua validade.

Segue abaixo uma figura que demonstra como são as colônias de bactérias lácticas presentes nos leites fermentados analisados nesta pesquisa, a placa de Petri é referente a uma diluição de 10^{-8} de uma das marcas avaliadas, próxima aos dias de validade.



Fotografia 2: Contagem de bactérias lácticas, próxima a data de validade em uma diluição de 10^{-8} .

6 CONCLUSÃO

O consumidor brasileiro atualmente encontra à sua disposição, nas prateleiras dos supermercados, uma crescente variedade de leites fermentados. Essa tendência pode ser associada com a consciência de que o consumo desses alimentos traz benefícios à saúde. Com isso, as indústrias, de um modo geral, têm investido na produção desse derivado do leite.

Dentro disso com a evolução dos conhecimentos na área microbiológica, as quais vem crescendo exponencialmente e os benefícios encontrados em bactérias lácticas vem sendo notáveis, verifica-se que as vantagens proporcionadas ao intestino justificam o aparecimento de produtos alimentícios probióticos que utilizam as bactérias lácticas como fermentação.

Os alimentos funcionais tem sido cada vez mais utilizados, e os leites fermentado devem seguir legislações as quais garantam ao consumidor que tais produtos contenham realmente o que é especificado.

O presente trabalho teve como objetivo verificar se tais legislações estão sendo cumpridas adequadamente, realizando análises físico-químicas e microbiológicas em três diferentes marcas de leite fermentados encontrados no supermercado.

Todas elas demonstraram-se estar adequadas a legislação brasileira, e em alguns pontos como bactérias lácticas viáveis se demonstraram acima do que a legislação determina como mínimo permitido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, Aloísio José. **Funcionalidade de proteínas do soro do leite bovino**. 1º Edição. Barueri, SP. Editora: Manole, 2003.

BEZERRA, José R.M.V; KOPF, Cristiane; ARGANDOÑA, Eliana Janet Sanjinez; KLOSOWSKI, Ana Cláudia; D'AGOSTINHO, João; LIMA, Kely Priscila; PEREIRA, Milene O; RIGO, Maurício. **Tecnologia de fabricação de derivados de leite: Boletim técnico**. Guarapuava,PR. Editora: Unicentro, 2008.

BORGES, Kátia Cristina; MEDEIROS, Adja Cristina Lira de; CORREIA, Roberta Targino Pinto. **logurte de leite de búfala sabor cajá (*Spondias Lutea L.*): Caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos**. Alim. Nutr. ISSN 0103-4235 , Araraquara, v.20, n.2, p. 295-300, abr./jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Resolução nº5, de 13 de novembro de 2000. Publicada no Diário Oficial da União de 27 de novembro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 de agosto 2003

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 agosto 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites fermentados**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 outubro 2007.

BURITI, Flávia Carolina Alonso; SAAD, Susana Marta Isay. **Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probiótico em**

alimentos e sua importância para saúde humana. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION, Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, Vol. 57 N° 4, São Paulo - SP, 2007.

CUNHA, Thiago Meurer; CASTRO, Fabiane Picinin de ; BARRETO, Pedro Luiz Manique; BENEDET, Honório Domingos ;PRUDÊNCIO, Elane Schwinden. **Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-116, jan./mar. 2008.

FERREIRA, Célia Lúcia de Luces fortes. **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção.** Rio de Janeiro- RJ. Editora: Rubio, 2012.

GALLINA, Darlila Aparecida; ALVES, Adriana Torres Silva; TRENTO, Fabiana Katia Helena de Souza; CARUSI, Juliana. **Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira.** UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2011;13(4):239-44.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico - químicos para alimentos.** 4° Edição. Versão eletrônica. São Paulo, 2008.

KEMPKA, A. P.; KRÜGER, R.L.; VALDUGA, E.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. **Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica** - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – URI, RS, 2007

MADEIRA, Márcia; FERRÃO, Maria Eliza Marti. **Alimentos conforme a lei.** 1° Edição. Barueri, SP. Editora: Manole, 2002.

MENDES, Debora Pinheiro Guimarães. **Características físico-químicas e microbiológicas e aceitação sensorial de leites fermentados pro bactérias produtoras de ácido láctico isolada de queijo coalho de Pernambuco.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA Maricê N.; DAMIN, M. Regina Damin. **Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado.** Ciênc. Tecnol. Alimentos. vol.23 suppl.0 Campinas dez. 2003.

PEIXOTO, Aristeu Mendes. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. 4º Edição. São Paulo. Editora: Universidade de São Paulo, 2002.

PIARD, J.C. Le Loir, Y. Poquet, I. Langella, P. **Bactérias lácticas: as bactérias lácteas no centro de novos desafios tecnológicos**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Encarte Especial, 2011.

SANTOS, Calila Teixeira; COSTA, Angélica Ribeiro; FONTAN, Gabrielle Cardoso Reis; FONTAN, Rafael da Costa Ilhéu; BONOMO, Renata Cristina Ferreira. **Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga**. Alim. Nutr. ISSN 0103-4235 , Araraquara, v.19, n.1, p. 55-60, jan./mar. 2008.

SILVA, Neusely da; et all. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3º Edição. São Paulo - SP. Editora: Varela, 2007.

THAMER, Karime Gianetti; PENNA, Ana Lúcia Barretto. **Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(3): 589-595, jul.-set. 2006.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3º Edição. Editora UFSM – Santa Maria, 2008.