

JANAÍNA ALVES DOS REIS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
LEVEDURAS EM BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS, COM
ADIÇÃO DE POLPAS DE FRUTAS, COMERCIALIZADAS NA
REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de São José do Rio Preto - SP, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto - SP

fevereiro de 2008



Campus de São José do Rio Preto
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JANAÍNA ALVES DOS REIS

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
LEVEDURAS EM BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS, COM
ADIÇÃO DE POLPAS DE FRUTAS, COMERCIALIZADAS NA
REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - UNESP - Campus de São José
do Rio Preto - SP, para obtenção do título de
Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

São José do Rio Preto
fevereiro de 2008

JANAÍNA ALVES DOS REIS

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
LEVEDURAS EM BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS, COM
ADIÇÃO DE POLPAS DE FRUTAS, COMERCIALIZADAS NA
REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

2º. Examinador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

3º. Examinador: Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto

fevereiro de 2008

DADOS CURRICULARES

JANAÍNA ALVES DOS REIS

NASCIMENTO: 03.10.1981 - São José do Rio Preto - SP

FILIAÇÃO: José Carlos Alves Donalsonso
Maria Elisabeth dos Reis Alves

2001/2004: Curso de Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado), no Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP.

2006/2008: Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (UNESP) - São José do Rio Preto - SP.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de São José do Rio Preto - SP.

*Um certo grau de oposição é importante para o homem.
As pipas sobem contra, e não com o vento.*

John Neal

Dedico este trabalho...

Aos meus pais José Carlos e Maria Elisabeth, pelo amor incondicional e pela renúncia pessoal em favor de minha formação.

A minha avó Olímpia, que me acolheu em seu lar e em amor...

...a minha eterna gratidão !

Os meus mais sinceros agradecimentos ...

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pelo incentivo, dedicação e paciência durante todos esses anos (desde o segundo ano de minha Graduação) em que tive o privilégio de trabalhar sob sua orientação e por ter me proporcionado crescimento acadêmico e pessoal;

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro;

À todos meus professores do curso de Graduação, verdadeiros educadores, mas principalmente AMIGOS, não somente pelo conhecimento transmitido, como também incentivo e apoio... Às Profas. Dras. Valéria Stranghetti, Maria Astride Saad Corradi, Eliana Rosa de Palma Fernandez, Lílian Castiglioni, Kátia Regina Penteado Mandrá, Zélia Aparecida Valsechi da Silva e ao Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei;

Aos meus companheiros de laboratório, Alexandre Rodrigo Coelho, Maria Luiza Silva Fazio, Sandra Isabel Franzotti Gubolino, Vidiany Aparecida Queiroz Santos e principalmente à minha amiga Fernanda Rosan Fortunato Seixas, que se fez presente a cada dia com sua alegria, cumplicidade, apoio e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis. À você Fer, a minha mais profunda admiração e amizade !

A todos os funcionários e técnicos de laboratório, principalmente à ÚNICA Tânia Maria Vinturim Gonçalves, pela dedicação, companheirismo e incentivo nos bons e maus momentos;

A todos os professores do curso de Pós-Graduação, principalmente a Profa. Dra. Mieko Kimura pela amizade, companheirismo e incentivo;

Às colegas do Curso de Pós-Graduação Crislene Barbosa de Almeida, Fernanda Roberta Carnielo Garcia, Gisele Ferreira Bueno, Jupyracyara Jandira de Carvalho Barros, Analice Cláudia de Azevedo, Raquel Gutierrez Gomes, Thaís de Souza Rocha, Carolina Wingeter Merheb, Ellen Silva Lago e principalmente à Tatiana Dias Leite que em pouco tempo se tornou uma pessoa especial, com sua doçura e alegria;

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho e Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz por terem prestado valiosas sugestões e correções por ocasião do exame geral de qualificação;

À minha grande amiga Dra. Vivian Melo que mesmo distante fisicamente, sua amizade e seu apoio se fizeram presentes a cada dia em minha vida...

À minha amiga-irmã Camilla e filhos, Ian e Cauã, afilhado amado, meus tesouros... Obrigada por tudo, minha amiga !

Ao meu namorado Mario e sua mãe Maria Cristina, pelo amor, paciência, apoio e incentivo constantes, por estarem ao meu lado e me proporcionarem momentos felizes;

À todos meus familiares pelo apoio e incentivo, principalmente a minha Tia Fátima, que me faz presente a cada dia em suas orações...

*Em especial, à minha querida vovó Olimpia, "Nina", que me concedeu o privilégio de sua companhia; agradeço pelas noites mal dormidas, pelas preocupações, pelos sorrisos e lágrimas, por toda dedicação e por todo amor com os quais cuidou de mim durante todos esses quase 8 anos juntas...
À você Nina, minha melhor amiga, minha eterna admiração, respeito e amor !*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVOS	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1. Bebida láctea fermentada	5
4.1.1. Etapas do processamento de bebida láctea fermentada	9
4.1.1.1. Matérias-primas e preparo da mistura	9
4.1.1.2. Padronização do conteúdo de gordura do leite	9
4.1.1.3. Adição de açúcares e/ou agentes edulcorantes	10
4.1.1.4. Adição de estabilizantes	10
4.1.1.5. Homogeneização	11
4.1.1.6. Tratamento térmico	12
4.1.1.7. Resfriamento I	13

4.1.1.8. Processo de fermentação	13
4.1.1.9. Resfriamento II	15
4.1.1.10. Adição de polpa de frutas, aromas e corantes	16
4.1.1.11. Envase	18
4.1.1.12. Armazenamento, transporte e distribuição	18
4.2. Soro de leite	19
4.3. Qualidade microbiológica	22
4.4. Conservantes alimentícios	27
4.4.1. Ácido benzóico e seus sais	28
4.4.2. Sorbato de potássio	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1. Obtenção das amostras	30
5.2. Preparo das amostras	30
5.3. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas	31
5.4. Enumeração de bolores e leveduras	31
5.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes (coliformes totais ou à 35°C)	32

5.6. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes (fecais ou à 45°C)	32
5.7. Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	32
5.8. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	33
5.9. Isolamento e manutenção das culturas de leveduras	34
5.10. Provas taxonômicas	34
5.11. Provas morfológicas	35
5.12. Provas fisiológicas	35
5.12.1. Capacidade fermentativa	35
5.12.2. Desenvolvimento em diversas temperaturas	36
5.12.3. Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato	36
5.12.4. Resistência à pressão osmótica	36
5.12.5. Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione)	37
5.12.6. Síntese de amido	37
5.12.7. Provas de assimilação de fontes de carbono	37
5.13. Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação vigente para produtos lácteos	38

5.14. Técnica de <i>Replica-plate</i>	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1. Análises microbiológicas	40
6.2. Isolamento das culturas de leveduras	46
6.3. Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação para produtos lácteos	60
6.3.1. Benzoato de sódio	61
6.3.2. Sorbato de potássio	64
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas	8
Figura 2. Esquema de obtenção do soro de leite	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos estabilizantes e suas concentrações permitidas	11
Tabela 2. Relação dos corantes e suas concentrações permitidas	17
Tabela 3. Composição média e pH dos soros doce e ácido	20
Tabela 4. Apresentação dos resultados nas diferentes avaliações	40
Tabela 5. Distribuição das leveduras segundo a origem	50
Tabela 6. Distribuição das espécies de leveduras segundo as origens	51
Tabela 7. Distribuição dos grupos de acordo com espécie e origem	52
Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras	53
Tabela 9. Leveduras resistentes ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas	63
Tabela 10. Leveduras resistentes ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas	69

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar a qualidade microbiológica de bebidas lácteas fermentadas, com adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP, por meio das seguintes análises: contagem de bactérias aeróbias mesófilas, enumeração de bolores e leveduras, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes e coliformes termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., sendo realizado ainda a determinação do pH eletrométrico. Dos resultados, observou-se que das 31 amostras (100,00%) analisadas, 5 (16,13%) foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” e, portanto, “produtos impróprios para consumo humano”, por apresentarem coliformes termotolerantes acima do padrão estabelecido pela legislação vigente. Destas amostras, foram ainda isoladas 74 leveduras (100,00%), que foram submetidas às provas taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e de assimilação de várias fontes de carbono. De acordo com as provas taxonômicas, verificou-se que esses microrganismos pertenciam as seguintes espécies: *Cryptococcus albidus* (1,35%), *Cryptococcus laurentii* (1,35%), *Candida edax* (1,35%) e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (95,95%). Foi verificada também a resistência dessas leveduras em relação aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação brasileira, como benzoato de sódio (INS - 211) nas concentrações de 0,10; 0,20 e 0,40% e sorbato de potássio (INS - 202) nas de 0,015; 0,03; 0,05; 0,06; 0,10; 0,20 e 0,40%. As concentrações de 0,20% de benzoato de sódio e 0,40% de sorbato de potássio foram as mais eficazes, representando respectivamente, 50,67 e 81,33% das culturas sensíveis à presença dos conservantes testados. Recomenda-se, portanto como fundamental, tendo em vista os resultados obtidos, o contínuo

monitoramento das diferentes etapas envolvidas no processo de elaboração desses produtos, para garantir a idoneidade à vida útil dos mesmos, bem como para minimizar os danos à saúde do consumidor.

Palavras-chave: qualidade microbiológica, bebida láctea fermentada, taxonomia de leveduras, benzoato de sódio, sorbato de potássio.

ABSTRACT

This study was objective in order to evaluate the microbiological quality of fermented dairy beverages, with the addition of fruit pulps, commercialized in the region of São José do Rio Preto, SP, through the following analyses: mesophilic aerobic bacteria count, enumeration of moulds and yeasts, determination of the Most Probable Number (MPN) of total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp research, being the determination of pH still carried on. The results pointed out that 5 (16.13%) out of 31 (100.00%) analyzed samples were classified as “products in unsatisfactory sanitary conditions”, therefore “inappropriate products for human consumption”, because they present thermotolerant coliforms above the standard established by the current legislation. Seventy-four (74) yeasts were isolated from the samples (100.00%), which were submitted to taxonomic, morphological and physiological tests, and to carbon source assimilation tests, as well. According to the taxonomic tests, those microorganisms belonged to the following species: *Cryptococcus albidus* (1.35%), *Cryptococcus laurentii* (1.35%), *Candida edax* (1.35%) e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (95.95%). The resistance of these yeasts in relation to the main food preservatives present in Brazilian legislation, such as benzoate sodium (INS - 211) at concentrations of 0.10; 0.20 and 0.40% and potassium sorbate (INS - 202) at 0.015; 0.03; 0.05; 0.06; 0.10; 0.20 and 0.40%; was also reported. The concentrations of benzoate sodium at 0.20% and potassium sorbate at 0.40% were the most effective, representing 50.67% and 81.33%, of the sensitive cultures to the presence of the preservatives tested. So, based on the results, the current monitoring of the different phases involved in the manufacturing

process of these products is fundamental, in order to assure the capacity to their useful life as well as to minimize the damage to the consumer's health.

Key-words: microbiological quality, fermented dairy beverages, taxonomy of yeasts, sodium benzoate, potassium sorbate.

1. INTRODUÇÃO

Motivadas, cada vez mais, pelas exigências dos consumidores por produtos saudáveis e que proporcionem prazer, as indústrias lácteas se empenham, incansavelmente, no desenvolvimento de produtos que atendam aos anseios deste mercado. Tal perspectiva abriu caminho para o progresso do mercado lácteo.

O desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas tem como objetivo, satisfazer este mercado por se tratar de um produto que, além de oferecer benefícios à saúde, devido a sua qualidade nutricional, constitui-se em um produto de baixa viscosidade, devido à incorporação do soro de leite, propiciando maior praticidade para seu consumo; a adição de soro ao produto, além de, tornar-se uma das alternativas para a sua utilização racional, reduz o custo do produto para o fabricante e conseqüentemente para o consumidor.

Apesar da simplicidade e de todas as inovações tecnológicas, o processamento das bebidas lácteas pode estar sujeito a inúmeras fontes de contaminação, principalmente de origem microbiana, quando não atendidas as condições elementares de higiene, resultando em alterações indesejáveis no produto final.

Portanto, a qualidade é um tópico fundamental a ser analisado, desde a obtenção da matéria-prima até o momento em que o produto final é oferecido ao consumidor, uma vez que, é ela que determinará se o produto está apto ou não para o consumo.

As bebidas lácteas são definidas como alimentos ácidos, isto é, pH variando entre 4,0 a 4,5. Tais valores podem dificultar a proliferação de

microrganismos patogênicos, o mesmo não se pode dizer com relação aos deteriorantes (bolores e leveduras); estes, quando presentes, encontram condições ótimas de desenvolvimento, o que faz deste produto, um excelente "meio de cultivo".

A presença de bolores e leveduras é considerada indesejável, por promover a sua deterioração, por meio de excessiva fermentação seguida de formação de gás, resultando em alterações depreciativas e comprometimento de sua vida de prateleira.

Face a isto, torna-se necessária uma avaliação da qualidade microbiológica de bebidas lácteas fermentadas, com adição de polpas de frutas, por meio da pesquisa de bioindicadores de contaminação, como as bactérias do grupo coliforme, *Salmonella* spp., bolores e leveduras.

2. JUSTIFICATIVA

A relevância deste trabalho reside em abordar a questão da qualidade microbiológica das bebidas lácteas fermentadas, sob uma perspectiva quase que puramente higiênico-sanitária, no sentido de verificar os padrões estabelecidos pela legislação em vigor, uma vez que é grande e variada a microbiota contaminante, responsável pela perda das características intrínsecas do produto, bem como o comprometimento dos laticínios em atendê-los.

Assim, a pesquisa por patógenos, bem como o isolamento e a identificação de leveduras em bebidas lácteas fermentadas permitem o conhecimento da microbiota potencial de contaminação, tornando-se possível, por meio de análises microbiológicas, diagnosticar os possíveis meios de contaminação e assim, reduzir tais microrganismos.

3. OBJETIVOS

Conforme elucidado, este trabalho foi desenvolvido baseando-se nos seguintes objetivos:

- Realizar as análises microbiológicas preconizadas na legislação brasileira vigente, assim como a enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, em diferentes amostras de bebidas lácteas fermentadas, com adição de polpas de frutas;
- Determinar o pH eletrométrico das amostras;
- Identificar as diversas leveduras isoladas;
- Verificar a resistência das mesmas em relação aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação brasileira.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Bebida Láctea Fermentada

O interesse e a procura por produtos saudáveis e nutritivos têm crescido de forma bastante significativa principalmente nos últimos anos, o que resulta em diversos estudos no setor de produtos lácteos. Vários desses têm dado relevância ao valor nutricional dos ingredientes, bem como à importância de uma dieta baseada em derivados lácteos (THAMER; PENNA, 2006).

Os derivados lácteos são alimentos amplamente consumidos pela população, não apenas pelas características sensoriais, mas também por suas propriedades nutricionais. São inúmeras as variedades destes preparados no mercado, entretanto, os consumidores exigem produtos cada vez mais diferenciados, e a indústria de laticínios procura atender aos requisitos da população, incluindo novos sabores, novas texturas e formas de apresentação, aliados a menores custos (MAGALHÃES et al., 2005).

Os iogurtes líquidos e as bebidas lácteas foram considerados os produtos mais competitivos, apresentando melhor desempenho no mercado, com grande número de lançamentos em diversos tipos de embalagens, visando oferecer ao consumidor uma maior gama de opções (MANZIONE JR., 1996).

Somadas aos iogurtes líquidos, as bebidas lácteas representam cerca de 42,7% do consumo de produtos lácteos no Brasil (FERREIRA, 2003). Sua popularidade se deve, principalmente, aos seus

benefícios nutricionais, ao menor custo do produto para o fabricante, à redução do preço final para o consumidor e por apresentar baixa viscosidade, sendo consumida como bebida suave e refrescante (SANTOS; FERREIRA, 2001).

No mercado brasileiro, o tipo mais comum de bebida láctea é aquela à base de iogurte e soro de queijo em sua formulação (FERREIRA, 2002). Mais especificamente, são produtos formulados contendo iogurte, soro de leite, polpa de frutas, outras matérias-primas e aditivos permitidos. O produto final deve apresentar os microrganismos de forma viável e abundante (LIMA, 2003).

Entende-se por bebida láctea o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT - ultra alta temperatura - UAT, 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 (BRASIL, 2005).

Bebida láctea fermentada: é o produto acima descrito, fermentado mediante a 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. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo 10^6 UFC/g, no produto final, para o (s) cultivo (s) láctico (s) específico (s) empregado (s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

Enquanto que, bebida láctea fermentada com adição, é o produto descrito anteriormente, adicionado de leite fermentado, produto ou substância (s) alimentícia (s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo 10^6 UFC/g, no produto final, para o (s) cultivo (s) láctico (s) específico (s) empregado (s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

A produção de bebida láctea, adicionada de soro de leite em sua formulação, vem ganhando um mercado muito grande, principalmente com o maior nível de informação sobre a importância do cálcio, a qualidade das proteínas, o papel dos componentes bioativos e das bactérias probióticas para a saúde, do custo do produto para o fabricante e do preço final para o consumidor (FERREIRA, 1997, 2002; NIELSEN, 1997; SANTOS; FERREIRA, 2001; VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000).

O processo de fabricação das bebidas lácteas fermentadas é bastante simples, como elucidado na Figura 1, utilizando-se principalmente os equipamentos disponíveis nas indústrias lácteas. O soro pode ser pasteurizado e adicionado após o término da fermentação ou misturado ao leite antes do tratamento térmico, seguido de fermentação (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002).

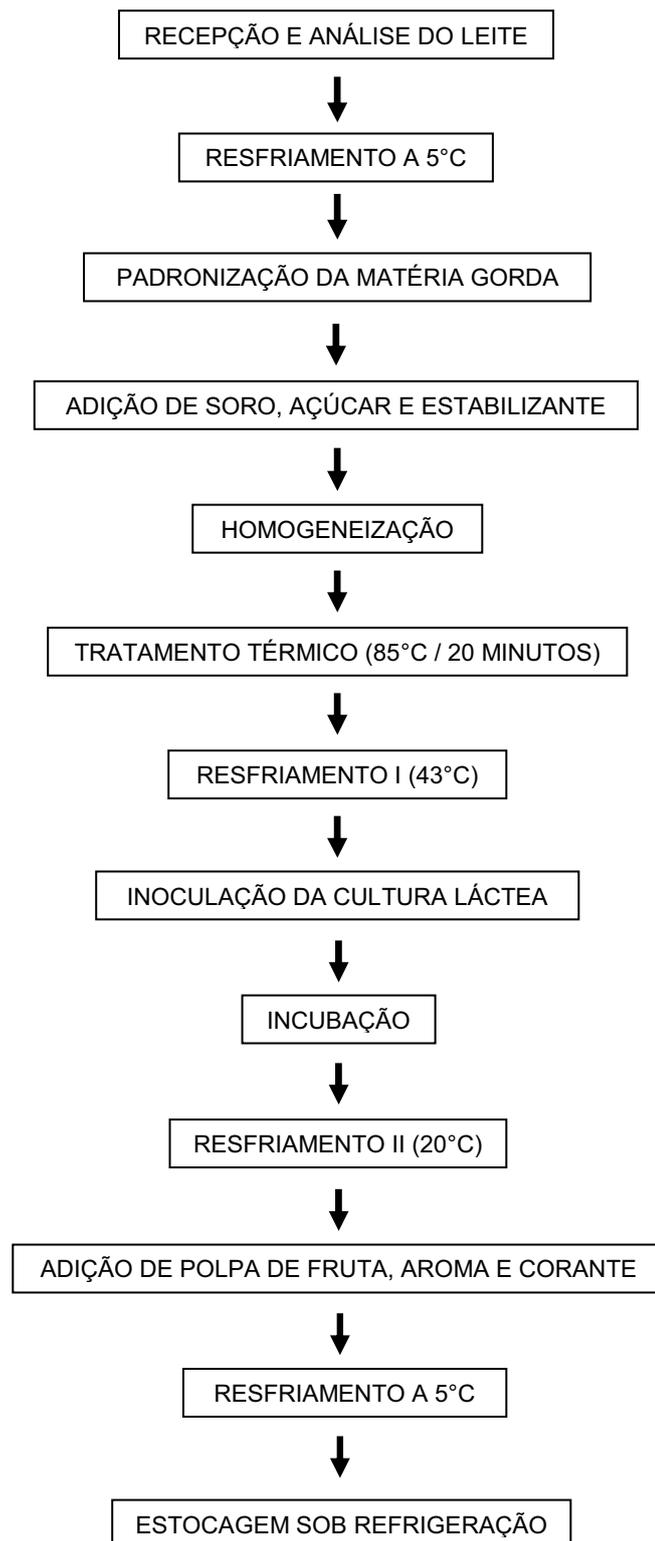


Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas (MADUREIRA, 2004).

4.1.1. Etapas do processamento de bebida láctea fermentada

4.1.1.1. Matérias-primas e preparo da mistura

O leite, usado como base das bebidas lácteas, deve ser de boa qualidade, higienicamente produzido e manipulado, devendo ser conservado ao abrigo da luz, de composição normal e isento de antibióticos e conservantes (RASIC; KURMANN, 1978).

Quanto ao soro de leite, constituinte do produto em questão, sua composição pode variar substancialmente dependendo do tipo de queijo produzido ou do método de extração da caseína empregado (PEREIRA, 2002).

As matérias-primas mencionadas deverão ser cuidadosamente avaliadas por meio de análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas, devendo apresentar de maneira geral, ausência total ou a presença mínima de substâncias estranhas, ausência de microrganismos patogênicos, de resíduos de antibióticos e sanitizantes, sabor e odor normal e extrato seco elevado (TAMIME; ROBINSON, 1991).

4.1.1.2. Padronização do conteúdo de gordura do leite

A padronização do leite depende do tipo de produto desejado: integral, padronizado, semidesnatado ou dietético. O conteúdo de gordura dos distintos tipos de produtos lácteos fermentados, elaborados nas diferentes partes do mundo, varia de 0,1 a 10,0%, sendo necessário padronizar o leite

para atender as especificações das normas legais recomendadas (TAMIME; ROBINSON, 1991).

Bebida láctea com adições, que apresente características sensoriais iguais ou semelhantes à bebida láctea sem adição, deve ter no mínimo 2 g/100 g matéria gorda de origem láctea (BRASIL, 2005).

4.1.1.3. Adição de açúcares e/ou agentes edulcorantes

A principal finalidade da adição de açúcares ou agentes edulcorantes é atenuar a acidez do produto (TAMIME; ROBINSON, 1991). O açúcar normalmente é adicionado na forma sólida antes da pasteurização e deve preferencialmente ser refinado para evitar a incorporação de impurezas. A concentração de sacarose pode variar de 0 a 12,0%. Acima deste valor pode haver um aumento da pressão osmótica, suficiente para inibir o desenvolvimento normal das bactérias da cultura (BRANDÃO, 1997).

Os edulcorantes devem ser adicionados depois da pasteurização para evitar a degradação térmica (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

4.1.1.4. Adição de estabilizantes

Os estabilizantes são utilizados com o objetivo de reduzir ou eliminar o risco de sinérese, aumentar a viscosidade do produto final, melhorar a cremosidade (TAMIME; ROBINSON, 1991) e até mesmo para reduzir custos, à medida que permitem a redução de calorias do produto final (NICOLAU;

OLSEN, 2002). De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005), os estabilizantes e suas concentrações máximas permitidas estão evidenciados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos estabilizantes e suas concentrações permitidas (BRASIL, 2005).

Identificação	Estabilizante	Concentração máxima no produto final
	Todos os aprovados como BPF	quantum satis
339 i	Fosfato monossódico, fosfato de sódio monobásico, monossódio dihidrogênio monofosfato	0,10 (como P ₂ O ₅)
339 ii	Fosfato dissódico, fosfato de sódio dibásico, dissódio hidrogênio monofosfato	0,10 (como P ₂ O ₅)
339 iii	Fosfato trissódico, fosfato de sódio tribásico, trissódio monofosfato	0,10 (como P ₂ O ₅)
340 i	Fosfato monopotássico, monofosfato Monopotássico	0,10 (como P ₂ O ₅)
340 ii	Fosfato hidrogênio dipotássico, monofosfato dipotássico	0,10 (como P ₂ O ₅)
481 i	Estearoil lactilato de sódio	0,10
482 i	Estearoil lactilato de cálcio	0,10
491	Monoestearato de sorbitana	0,15
492	Triestearato de sorbitana	0,15
495	Monopalmitato de sorbitana	0,15

4.1.1.5. Homogeneização

A homogeneização promove a dispersão homogênea dos constituintes, principalmente a gordura, melhorando sabor, consistência,

apresentação e digestibilidade do produto (RASIC; KURMANN, 1978; ABREU, 2000). Reduz também a susceptibilidade de sinérese e a formação de grânulos. Entretanto, é necessária a definição de uma pressão ótima para cada tipo de produto fermentado, para evitar um aumento na separação do soro (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

4.1.1.6. Tratamento térmico

O tratamento térmico do leite ou da mistura tem como objetivo principal destruir os microrganismos patogênicos para melhorar a qualidade do produto, inativar as enzimas, melhorar a consistência e a viscosidade do produto e diminuir a sinérese (RASIC; KURMANN, 1978). Acima de 70°C as proteínas do soro sofrem desnaturação e algumas delas se associam à micela de caseína, envolvendo a k-caseína, por meio de interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto intermoleculares, favorecendo as ligações cruzadas entre as partículas de caseína na rede do gel, levando ao aumento de sua rigidez (LUCY, 2002).

Existem controvérsias na literatura a respeito do tipo de tratamento térmico que proporciona melhor atividade de fermentação, havendo, portanto, uma faixa de temperatura de inibição e de ativação das bactérias, devido à formação de sulfetos voláteis, à redução do potencial de oxirredução, ao pH e à desnaturação protéica. Somados aos efeitos de temperatura, existem fatores ligados à composição físico-química, tais como o teor de sólidos não gordurosos, o conteúdo total de sólidos, a qualidade do leite, a atividade de água e a variabilidade entre as culturas, que também podem

influenciar na avaliação mais completa do efeito da temperatura no processo fermentativo de iogurtes e bebidas lácteas. Na prática, observam-se os seguintes binômios de tempo-temperatura: 80°C/30 minutos; 85°C/15 minutos; 90°C/5 minutos; 95°C/3 minutos (BRANDÃO, 1997).

O tratamento térmico pode estimular o início do desenvolvimento das bactérias do fermento por redução do conteúdo de oxigênio do leite e, dependendo das condições aplicadas, pode favorecer ou inibir o desenvolvimento posterior (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

4.1.1.7. Resfriamento I

Após o tratamento térmico, a mistura é resfriada na faixa de 40-45°C para a inoculação da cultura láctea (TAMIME; ROBINSON, 1991). Esta faixa de temperatura corresponde à média daquelas ótimas dos *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (39°C); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (45°C); *Lactobacillus acidophilus* (38°C) e *Bifidobacterium* spp. (39°C), e favorece o desempenho destes microrganismos por meio da cooperação estabelecida entre eles (GOMES; MALCATA, 1999).

4.1.1.8. Processo de fermentação

A fermentação pode ser entendida como o processo metabólico no qual ocorrem mudanças químicas nos componentes orgânicos do leite, quais sejam proteínas, carboidratos e gorduras, por meio da ação de enzimas elaboradas pelas bactérias lácticas (BRANDÃO, 1997).

Os microrganismos utilizados na fermentação da bebida láctea se apresentam na forma de bacilos ou cocos, Gram-positivos, na maior parte aerotolerantes, catalase e oxidase negativas (VARNAN, SUTHERLAND, 1994). Predominantemente as bactérias encontradas em iogurtes e seus derivados são: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, doravante denominados de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e o número total de bactérias viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g no produto final (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

Neste processo, basicamente, ocorrem os seguintes fenômenos:

a) Transformação da lactose em ácido láctico, conferindo o sabor ácido, abaixando o pH para 4,6 que corresponde ao ponto isoelétrico da caseína, provocando a coagulação do leite;

b) Produção de diversos compostos voláteis, sendo o acetaldeído o principal deles;

c) Formação de outros compostos, tais como exopolissacarídeos, que aumentam a viscosidade, além de ácido fólico e bacteriocinas (TAMIME; ROBINSON, 1991).

A temperatura de fermentação se dá na faixa de 40 a 43°C, sendo este o intervalo médio entre as temperaturas ótimas de desenvolvimento dos microrganismos da cultura iniciadora, também chamada de “starter”, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (39°C) e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (45°C). O cultivo iniciador, “starter”, é inoculado em uma proporção de aproximadamente 2,0%, podendo variar de 1,0 a 5,0% do volume para proporcionar uma concentração inicial entre 10^6 a 10^7 UFC/mL composto por

quantidades aproximadamente iguais de cada um dos microrganismos (ADAMS; MOSS, 1997). A porcentagem de sementeira dependerá do poder acidificante da cultura, do tempo de incubação desejado, da quantidade de células bacterianas existentes, da relação lactobacilos/estreptococos e do extrato seco do leite (KURMANN, 1977).

A fermentação dura aproximadamente 4 horas, durante as quais as bactérias promovem a transformação da lactose em ácido láctico. A presença deste ácido provoca a diminuição do pH de 6,3 a 6,5 para aproximadamente 4,6, ponto isoelétrico da caseína, quando as micelas se agregam para produzir um gel contínuo, no qual estão agrupados todos os componentes e onde a presença de soro é insignificante ou nula (ADAMS; MOSS, 1997).

Vale ressaltar que, durante o processo de fermentação, é de vital importância a manutenção e/ou o controle do pH, uma vez que, a separação do soro relaciona-se diretamente a este parâmetro (THAMER; PENNA, 2006).

4.1.1.9. Resfriamento II

Como a elaboração das bebidas lácteas fermentadas consiste em um processo biológico, é necessário o monitoramento da temperatura para otimizar a atividade metabólica dos microrganismos, a produção de ácidos e a atividade das enzimas. O objetivo do resfriamento é reduzir a temperatura do coágulo de 30-45°C em 10°C (para cessar a atividade microbiana), tão

rapidamente quanto seja possível, para controlar a acidez final (TAMIME; ROBINSON, 1991).

Atingindo o pH de 4,6, inicia-se o resfriamento até a temperatura atingir 15-20°C, evitando assim a fase de supermaturação tendo como conseqüência o aumento da acidez e a liberação de soro (sinérese). Em seguida procede-se a adição de polpa de frutas, aromas e corantes e o resfriamento final até a temperatura de 5°C (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

4.1.1.10. Adição de polpa de frutas, aromas e corantes

Além dos ingredientes mais comumente usados na mistura para a preparação de uma bebida láctea (leite, soro, açúcar, estabilizantes, entre outros), adiciona-se também compostos aromatizantes, corantes e à base de frutas (ou outros aditivos), para conferir características específicas ao produto (BRANDÃO, 1997).

De maneira geral, frutas frescas também podem ser utilizadas no processamento de produtos fermentados, porém o caráter sazonal de produção das mesmas e a variabilidade de sua qualidade limitam consideravelmente sua utilização pelas indústrias, sendo mais populares as conservas de frutas, principalmente pela possibilidade de padronizar a mistura com o objetivo de satisfazer as especificações desejadas pelos consumidores (TAMIME; DEETH, 1980).

O tratamento térmico dos preparados de frutas pode causar uma diminuição da intensidade do aroma. Por isso, a adição de agentes aromatizantes se faz necessária para compensar esses produtos. Os

aromatizantes são classificados, em função de sua origem, em três grupos: naturais, idênticos aos naturais e sintéticos ou artificiais (TAMIME; ROBINSON, 1991). Os aromas são utilizados para realçar os compostos químicos (aldeídos, cetonas, ésteres, etc.), e fazer com que o sabor do produto final seja semelhante ao sabor de frutas (BRANDÃO, 1997).

O objetivo da adição de corantes nas bebidas lácteas com sabor de frutas é de aumentar a atração do produto. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005) autoriza a utilização dos seguintes corantes segundo a Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos corantes e suas concentrações permitidas (BRASIL, 2005).

Identificação	Corante	Concentração máxima no produto final
1000 i	Curcumina, cúrcuma	0,008
101 i	Riboflavina	0,003
101 ii	Riboflavina 5 fosfato de sódio	0,003
110	Amarelo crepúsculo	0,005
120	Carmin, cochonilha, ácido carmínico	0,01 (como ác. carmínico)
122	Azorrubina	0,005
124	Ponceau 4R	0,005
129	Vermelho 40	0,005
131	Azul Patente V	0,005
132	Indigotina	0,005
133	Azul Brilhante FCF	0,005
140 i	Clorofila	quantum satis
141 i	Clorofila cúprica	0,005
141 ii	Clorofilina cúprica	0,005
143	Verde rápido FCF	0,005
150 a	Caramelo I simples	quantum satis
150 b	Caramelo II processo sulfito caústico	quantum satis
150 c	Caramelo III processo amônia	0,05
150 d	Caramelo IV processo sulfitoamônia	0,05
160 a i	Caroteno: beta-caroteno sintético	0,005
160 a ii	Carotenos naturais (alfa, beta e gama)	0,005
160 b	Urucum, bixina, norbixina	0,001 (como bixina)
162	Vermelho de beterraba, betanina	quantum satis

4.1.1.11. Envase

A escolha do material é de suma importância porque falhas cometidas na escolha da embalagem adequada podem trazer repercussões graves em termos econômicos e de saúde pública no que diz respeito à qualidade do produto embalado (MADUREIRA, 2004).

É imprescindível que, os materiais das embalagens que entram em contato direto com o produto sejam: atóxicos, resistentes a ácidos, impermeáveis ao oxigênio, quimicamente inertes, não reajam com o alimento e evitem a perda de substâncias voláteis responsáveis pelo aroma do produto (TAMIME; ROBINSON, 1991).

4.1.1.12. Armazenamento, transporte e distribuição

As bebidas lácteas fermentadas deverão ser conservadas e comercializadas em temperatura não superior a 10°C. O seu armazenamento nestas condições ocasiona uma diminuição das reações bioquímicas e biológicas resultantes da atividade metabólica das culturas lácteas e de possíveis contaminantes (TAMIME; ROBINSON, 1991). O transporte da indústria para o comércio deve ser o mais rápido possível e em caminhões refrigerados, principalmente no verão, para evitar a depreciação da qualidade do produto (ABREU, 2000).

As bebidas lácteas podem conter ainda outros ingredientes como: açúcares e/ou glicídios, maltodextrina, edulcorantes nutritivos e não nutritivos, frutas em pedaços/polpa/suco e outros preparados à base de frutas,

mel, cereais, vegetais, gorduras vegetais, chocolate, frutas secas, café, especiarias e outros alimentos aromatizantes naturais e inócuos e/ou sabores, amidos ou amidos modificados, gelatina ou outros ingredientes, produtos ou substâncias alimentícias (BRASIL, 2005).

4.2. Soro de leite

O soro de leite é definido como o líquido residual, obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005), isto é, tradicionalmente, se trata de um subproduto do processamento de queijos (conforme a Figura 2), sendo variável sua composição em função da matéria-prima, processamento, tratamento térmico, etc. Basicamente são duas as fontes de proteínas de soro: soro doce e soro ácido. O soro doce é resultante da manufatura tanto de queijos como da caseína usando renina como coagulante, com pH entre 6,2 a 6,5. O soro ácido pode ser obtido por meio da manufatura tanto da caseína ácida ou da fabricação de queijos por coagulação ácida, com pH ao redor de 4,6 a 4,7 (HARPER, 1992).

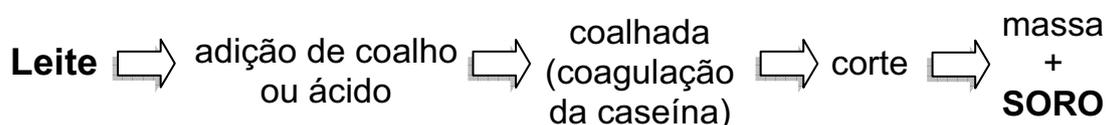


Figura 2. Esquema de obtenção do soro de leite (VAN DENDER; SPADOTI, 2006).

O soro de leite pode receber também a denominação de soro de queijo, sendo talvez aquela a forma mais adequada, uma vez que o soro se origina do leite e não do queijo (VAN DENDER; SPADOTI, 2006).

Como mencionado anteriormente, a composição do soro é variável por inúmeras razões, sendo classificados como doce e ácido. Portanto, apresenta-se na Tabela 3, a composição média e pH do soro doce e do ácido.

Tabela 3. Composição média e pH dos soros doce e ácido (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2004).

	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Umidade	93,00 - 94,00	94,00 - 95,00
Gorduras	0,30 - 0,50	0,30 - 0,60
Proteínas	0,80 - 1,00	0,80 - 1,00
Lactose	4,50 - 5,00	3,80 - 4,20
Cinzas	0,50 - 0,70	0,70 - 0,80
Ácido láctico	0,10	0,10 - 0,80
Cálcio	0,05	0,13
Sódio	0,07	0,06
Potássio	0,13	0,15
Fósforo	0,06	0,09
pH	6,40	4,70

Mais recentemente é considerado, por muitas indústrias lácteas, como um subproduto muito utilizado no preparo de outros. Representa cerca de 90,0% do peso do leite (BRANDÃO et al., 2006).

A lactose e as proteínas de alto valor biológico são os componentes mais importantes sob o ponto de vista nutricional. O soro de leite apresenta ainda quantidades significativas de vitaminas do complexo B e lipossolúveis e diversos minerais. Além do que, sua utilização na elaboração de

bebidas lácteas constitui-se numa forma racional de aproveitamento deste produto (GOMES, 2005).

As propriedades funcionais atribuídas aos produtos de soro são de grande importância para os fabricantes de produtos lácteos fermentados por apresentarem as chamadas características probióticas ou nutracêuticas. Os produtos de soro não só permitem ao fabricante reduzir o custo total dos ingredientes como também apresentam a importante vantagem de possuírem propriedades funcionais excepcionais (HUGUNIN, 1999).

Este derivado lácteo apresenta em sua composição aproximadamente 93,0-94,0% de água, 4,5-5,0% de lactose, 0,7-0,9% de proteínas solúveis, 0,6-1,0% de sais minerais e quantidades apreciáveis de outros componentes como vitaminas do grupo B (SISO, 1996).

A indústria nacional de laticínios produz em torno de 450.000 toneladas de queijo/ano, isso corresponde a aproximadamente 4.059.000 toneladas de soro de leite/ano (FLORENTINO et al., 2005). Acredita-se que 50,0% de todo o soro produzido não é aproveitado. Seu descarte no ambiente, sem o tratamento adequado, não é somente crime previsto por lei, como também desperdiçar uma matéria-prima de excelente qualidade (SANTOS; FERREIRA, 2001). Quando desprezado nos rios, além de se tratar de um desperdício econômico, a presença de soro torna-se um gravíssimo problema de poluição ambiental, devido às suas características orgânicas, com alta demanda biológica de oxigênio (DBO), da ordem de 30,0 a 40,0 g de oxigênio por litro de soro (NEVES, 1993).

A criação de alternativas para o aproveitamento adequado de soro de leite é de suma importância em função de sua qualidade nutricional, de

seu volume e principalmente de seu poder poluente. Dentre as alternativas cita-se o uso do soro *in natura* para alimentação animal, fabricação de ricota e de bebida láctea; concentrado; em pó; separação das proteínas e de lactose com posterior secagem, entre outros (REIS, 1999; RICHARDS, 1997; UNITED STATE DAIRY EXPORT COUNCIL - USDEC, 2004).

A vantagem da adição de soro ao final da fermentação é que a partir de uma única base, a indústria pode fabricar produtos diferentes variando-se a concentração de soro, aromas, polpas de frutas e corantes (MADUREIRA, 2004).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a utilização do soro em quantidades que variam de 30,0 a 70,0% do total, confere às bebidas lácteas características próximas às do iogurte natural em relação à coloração e aroma. A viscosidade pode variar de “relativamente baixa”, semelhante à de uma mistura de leite e suco de frutas, até “relativamente alta”, como a viscosidade dos tradicionais iogurtes para beber (SEIBEL; CANSIAN, 2000).

Sendo assim, a incorporação do soro em fórmulas de iogurtes oferece uma série de benefícios, não só econômicos, como também ao valor agregado ao produto final em função das melhores características de sabor, textura e outros parâmetros nutricionais (HUGUNIN, 1999).

4.3. Qualidade microbiológica

É fato que, a utilização de matérias-primas inadequadas, bem como a falta de cuidados durante o processamento e/ou armazenamento, acarreta uma série de inconvenientes, como observado em produtos que

pecam pela aparência, valor nutritivo e qualidade microbiológica (FREO; REOLON, 2006).

Um estudo de grande valia realizado por Careli, Dias, Andrade (2005) abordou as condições de processamento em micro-indústrias de leite, onde são relatadas algumas situações que se mostram justificáveis à má qualidade do produto final, como:

- Quanto à matéria-prima, os responsáveis pela produção, em sua maioria, não eram treinados para o desenvolvimento de produtos lácteos;
- Quanto às condições de processamento, algumas dessas micro-indústrias submetiam a matéria-prima (o leite) a um processo de pasteurização inadequado, devido às falhas do binômio tempo/temperatura, e, devido ao pequeno porte da empresa, seria inviável a mesma possuir um laboratório de análises de rotina, devido a isto, o serviço era terceirizado, sendo realizadas esporadicamente; nos equipamentos e utensílios foram observadas: ferrugem, ranhuras, presença de solda, equipamentos velhos e desgastados;
- Quanto à estrutura física, as micro-indústrias não eram projetadas para a fabricação de produtos lácteos, muitas delas não possuíam espaço físico adequado;
- Quanto ao pessoal, os manipuladores se apresentavam em condições “variadas”, assim denominadas pelos autores. Apenas uma única empresa apresentava seus manipuladores com uniformes completos, algumas, os apresentavam com uniformes incompletos, outras ainda, apresentavam seus funcionários totalmente sem uniformes e sem cabelos presos por toucas. Boa parte desses trabalhadores higienizavam as mãos corretamente.

Schulze e Fernandes (1997) igualmente enfatizaram sobre a importância da higiene em indústrias de alimentos, alertando que quando estes não são produzidos de maneira higiênica, tornam-se fontes de contaminação e/ou intoxicação.

Importante mencionar que, ao término do processamento, a temperatura e o tempo de armazenamento no comércio, determinarão a integridade do produto, pois grande parte dos postos de venda apresenta condições precárias de conservação e podem alterar a aparência e o prazo de validade do produto (ROGINSK, 1988).

Vale ressaltar que os fatores inerentes ao alimento, os chamados de parâmetros intrínsecos, como por exemplo, o pH e a atividade de água (Aa) e aqueles inerentes ao ambiente, ou seja, os parâmetros extrínsecos, como a temperatura, a umidade relativa (UR) e a presença de gases, interferem diretamente no desenvolvimento da microbiota natural ou contaminante do produto em questão (HOFFMANN, 2001).

A microbiota de alimentos pouco ácidos ($\text{pH} > 4,5$) é extremamente variada, havendo condições para o desenvolvimento da maioria das bactérias, inclusive as patogênicas, bolores e leveduras. Nos alimentos ácidos ($\text{pH} 4,0$ a $4,5$), como é o caso da maioria das bebidas lácteas fermentadas analisadas, a microbiota é mais restrita, representada por bactérias lácticas e algumas esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Os patógenos se desenvolvem com certa dificuldade, a não ser que a biota contaminante seja elevada. Nesta faixa de pH, os bolores e as leveduras encontram condições ótimas de desenvolvimento. Em alimentos considerados muito ácidos ($\text{pH} < 4,0$), os microrganismos capazes de se desenvolver

restringem-se apenas aos bolores e leveduras e, por vezes, bactérias lácticas e acéticas (HOFFMANN, 2001).

O controle da qualidade de alimentos vem sendo objeto de uma constante evolução, visando produzir e oferecer ao consumidor produtos de origem animal absolutamente de acordo com as normas específicas de segurança sanitária (FREO; REOLON, 2006).

Para se manter um produto alimentício com boa qualidade é necessário um maior rigor que vai desde a seleção das matérias-primas até o cumprimento das medidas higiênico-sanitárias, bem como na estocagem; desta forma, oferecer ao consumidor um produto idôneo, quer no âmbito industrial quer a nível comercial varejista (HOFFMANN; PENNA; VINTURIM, 1998).

A qualidade das matérias-primas e a higiene (de ambientes, manipuladores e superfícies) representam a contaminação inicial. O tipo de alimento e as condições ambientais regulam a multiplicação (HOFFMANN, 2001). A exemplo disso, casos onde foram encontradas elevadas contagens de *Escherichia coli* no leite (matéria-prima do produto em questão), pasteurizado inadequadamente, evidenciando, portanto a necessidade de melhorias na higiene nas indústrias leiteiras (GRAN et al., 2002).

Os coliformes são normalmente microrganismos utilizados como indicadores das condições higiênico-sanitárias em produtos lácteos. A presença desses microrganismos é sugestiva de condições ou práticas higiênicas insatisfatórias durante as etapas de produção (MENEZES et al., 2003). Sua investigação pode ser realizada por meio de avaliações microbiológicas desde o processamento até a disponibilidade do produto para o consumidor (BIROLLO; REINHEIMER; VINDEROLA, 2001).

Fleet (1990) esclareceu que a contaminação por leveduras está diretamente relacionada à adição de frutas, assim como práticas inadequadas de higiene durante o envase do produto. O autor relatou também que os produtos lácteos, de maneira geral, oferecem condições adequadas para o desenvolvimento e predominância de leveduras. Tal ocorrido justifica-se, devido às características intrínsecas dessa microbiota, sendo elas: fermentação ou assimilação de lactose, produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, assimilação de ácido láctico e ácido acético, desenvolvimento sob baixas temperaturas e elevada concentração de sal.

Para Walstra et al. (1999) o desenvolvimento de bolores e leveduras é favorecido, nestes produtos, simplesmente devido ao baixo pH e à elevada concentração de ácido láctico, portanto, meios propícios para o desenvolvimento desses microrganismos. Sua presença promove fermentação com formação de gás, resultando em sabores estranhos, deteriorando o produto, e conseqüentemente comprometendo a sua vida de prateleira. Tais microrganismos podem causar toxinfecções alimentares, evidenciando a necessidade de maior aperfeiçoamento dos cuidados na fabricação da matéria-prima e da engenharia de processo dos alimentos, tão como a inspeção mais eficaz destes produtos (ARAÚJO et al., 2001).

Portanto, a presença de bolores e leveduras não é desejada nas bebidas lácteas fermentadas, pois sua deterioração pode ser decorrente da ação desses microrganismos (SURIYARACHCHI; FLEET, 1981). Em virtude de sua contaminação, o produto caracteriza-se por um aroma de ácido acético associado ao gosto de ácido (GUEDES NETO et al., 2003).

4.4. Conservantes alimentícios

A conservação de alimentos tem como objetivo, oferecer produtos não só dotados de qualidades nutritivas, como também sensoriais e de palatabilidade normal e, principalmente, isentos de microrganismos nocivos e suas toxinas (EVANGELISTA, 2001). O método de conservação mais utilizado é o emprego de substâncias químicas, as quais atuam como antimicrobianas, isto é, impedem o desenvolvimento de bactérias, leveduras e bolores (LUCK, 1977).

Neste contexto, Evangelista (2001) definiu tais substâncias químicas como aditivos conservadores e preservadores que retardam os processos de deterioração de produtos alimentícios, protegendo-os contra a ação de microrganismos ou de enzimas, proporcionando um aumento na vida útil do produto.

Conforme elucidado por Sofos (1995), a escolha do conservante para a aplicação específica é alicerçada nos seguintes parâmetros: propriedades físicas e químicas como solubilidade, pKa, reatividade e toxicidade, tipos microbianos de interesse e as propriedades do produto a ser conservado.

Dentre as inúmeras propriedades do produto alvo de conservação, o pH é, sem dúvida, a que mais influencia na atividade antimicrobiana da substância conservante empregada. Baixos pH potencializam a atividade de ácidos minerais fracos como, nitritos e sulfitos e de ácidos lipofílicos fracos, sórbico, benzóico e propiônico (SOFOS, 1995).

Com o início da industrialização, a conservação tornou-se cada vez mais importante, e, o homem passou a questionar a qualidade das substâncias empregadas como conservantes, uma vez que muitas delas alteravam significativamente as propriedades e estruturas dos alimentos. Sendo assim, aumentaram-se os esforços para que tais substâncias, além de conservar os alimentos, mantivessem as propriedades nutritivas e sensoriais (LUCK, 1977).

4.4.1. Ácido benzóico e seus sais

O ácido benzóico é uma das mais antigas substâncias conservadoras utilizadas pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos (JAY, 1996), e, até nos dias de hoje, a mais utilizada devido ao seu baixo custo, à facilidade de incorporação aos produtos, à ausência de cor e à baixa toxicidade (CHIPLEY, 1993).

O ácido benzóico foi descrito pela primeira vez por Fleck em 1875, quando se empenhava em encontrar um sucessor do conhecido ácido salicílico. Todavia, como na época havia dificuldade para sintetizá-lo em grandes quantidades, sua utilização na conservação de alimentos foi introduzida no fim do século XIX (LUCK, 1977).

O benzoato de sódio apresenta atividade contra todos os microrganismos, sendo mais efetivo contra bactérias e leveduras (KIMBLE, 1977; SOFOS, 1995). A concentração mínima de ácido benzóico necessária para a inibição de microrganismos depende de fatores, como: tipo de substrato, pH do meio e microrganismo de interesse. As faixas de concentração mínima

para inibição variam de 50 a 1800 ppm para bactérias, 20 a 700 ppm para leveduras e para fungos de 20 a 500 ppm (LUCK, 1977).

4.4.2. Ácido sórbico e seus sais

Composto naturalmente presente na natureza, o ácido sórbico foi isolado pela primeira vez em 1859, pelo químico alemão Von Hofmann. Entretanto foi apenas em 1939 que sua ação antimicrobiana foi descoberta simultaneamente por Muller, na Alemanha e por Gooding, nos Estados Unidos (TFOUNI, TOLEDO, 2001).

Os sorbatos são mais eficientes principalmente contra fungos e leveduras, embora atuem também contra uma ampla variedade de bactérias (JAY, 1996). A concentração mínima de ácido sórbico necessária para a inibição de microrganismos varia dependendo de fatores como o tipo de substrato, pH do meio e microrganismo de interesse. As faixas de mínima concentração para inibição variam de 10 a 10000 ppm (bactérias), 25 a 400 ppm (leveduras) e para fungos de 10 a 1000 ppm. Quando comparado ao ácido benzóico, o ácido sórbico apresenta maior eficiência em pH acima de 4,5 (LUCK, 1977).

A principal desvantagem dos sorbatos é o seu custo relativamente maior do que o dos benzoatos e propionatos. Todavia, em produtos de maior pH eles são geralmente utilizados em quantidades menores do que os benzoatos e propionatos de modo a obter o efeito desejado (ROBACH, 1980).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção das amostras

Foram analisadas 31 amostras de bebidas lácteas fermentadas com adição de polpas de frutas, em embalagens de 1000,0 mL, dentro do prazo de validade, sendo 7 da marca A, referentes aos sabores: ameixa preta, coco, frutas vermelhas, mamão com laranja, morango, pêssego e salada de frutas; 4 da B, sabores: coco, morango, pêssego e vitamina: mamão, maçã e mamão, e da C, coco, morango, pêssego e salada de frutas; 3 da D, E, sabores: coco, morango e pêssego e da F, coco, morango e salada de frutas; 2 da G, mamão, banana e maçã e morango; 1 da H, I, J, K e L, exclusivamente representadas pelo sabor morango. Importante mencionar que todos os sabores das respectivas marcas avaliadas foram adquiridos e analisados. As mesmas foram acondicionadas em caixas de material isotérmico (isopor) contendo cubos de gelo e transportadas de imediato ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos - UNESP - Campus de São José do Rio Preto, SP (HARRIGAN; MC CANCE, 1976; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1978).

5.2. Preparo das amostras

No Laboratório cada amostra recebeu um código de identificação, ou seja, BL_n onde BL = bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas e n = número da amostra. A seguir, assepticamente 10,0 mL

da mesma foram colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90,0 mL de água destilada estéril, sendo homogeneizados posteriormente (diluição 10^{-1}). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais seriadas até 10^{-6} utilizando-se o mesmo diluente. As seis diluições obtidas, assim como a 10^0 , foram usadas, conforme necessárias, nas análises subseqüentes (ICMSF, 1980).

5.3. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

Foi pipetado assepticamente 1,0 mL das diluições previamente preparadas e colocado em placas de Petri devidamente identificadas. Adicionaram-se a seguir 15,0 mL de ágar padrão para contagem. Depois da homogeneização, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e calculou-se as unidades formadoras de colônias - UFC (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 1992).

5.4. Enumeração de bolores e leveduras

Foi pipetado assepticamente 1,0 mL de cada diluição e distribuído em placas de Petri esterilizadas e identificadas. Foram adicionados a cada placa 15,0 mL de ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a 10,0% (pH = 4,0), ambos esterilizados. Após solidificação as placas foram incubadas em estufa a 25°C por 5 dias. As UFC foram calculadas de acordo com as diluições (ICMSF, 1978).

5.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes (coliformes totais ou à 35°C)

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o caldo lauril sulfato triptose com incubação a 35°C durante 48 horas (THATCHER; CLARK, 1973).

5.6. Determinação do NMP de coliformes termotolerantes (fecais ou à 45°C)

Foi também usada a técnica dos tubos múltiplos, utilizando-se o caldo EC com incubação a 44,5°C durante 24 horas (BRASIL, 1981; 2003). A determinação do NMP de coliformes termotolerantes, assim como a de coliformes, foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

5.7. Pesquisa de *Escherichia coli*

A partir dos tubos de ensaio contendo caldo EC, usados na quantificação de coliformes termotolerantes que apresentaram turvação com gás no interior do tubo de Durham, foram semeados por esgotamento em placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno e incubadas a 35°C durante 48 horas. As UFC suspeitas, que possuíam 2 a 3 mm de diâmetro e se apresentaram azuis com centro negro e bordas claras à luz transmitida, e brilho metálico-esverdeado à luz refletida, foram identificadas utilizando-se os testes

bioquímicos (IMVIC), isto é, de indol/vermelho de metila/Voges-Proskauer/citrato (MARTH, 1978).

5.8. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Em 225,0 mL de caldo lactosado foram homogeneizados respectivamente, 25,0 mL de cada amostra. Depois da incubação a 35°C por 24 horas, 1,0 mL de cada cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10,0 mL de caldo selenito cistina, posteriormente incubados a 35°C. Após 24, 48 e 120 horas foram feitas sementeiras, em placas de Petri contendo ágar *Salmonella Shigella* incubadas a 35°C/48 horas (BRASIL, 1981; 2003). As UFC suspeitas foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para um tubo de ensaio contendo o meio para manutenção de culturas de bactérias, ágar padrão para contagem, e incubadas a 35°C por 24 horas. Posteriormente foram submetidas a um teste sorológico. Para isto, 2 (duas) gotas de solução salina fisiológica 0,85% estéril foram colocadas nas extremidades de uma lâmina. Uma alçada do microrganismo suspeito foi transferida para cada extremidade e homogeneizada com a solução salina, acrescentou-se 1 (uma) gota do soro somático polivalente anti - *Salmonella* sobre uma das gotas. A leitura foi realizada após 2 (dois) minutos de delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina. A ausência de aglutinação das misturas classificou a reação como negativa (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

5.9. Isolamento e manutenção das culturas de leveduras

A partir do experimento realizado para a enumeração de bolores e leveduras, foram isoladas após cinco dias de incubação a 25°C, 74 culturas de todos os tipos morfológicos existentes, sendo que colônias mais numerosas no ágar batata dextrose acidificado foram isoladas em maior proporção, visando conhecer aquelas predominantes. Em seguida, cada cultura pura recebeu um código de identificação, ou seja, BL_{n,n1} onde BL = bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas, _n = número da amostra e _{n1} = número da levedura isolada desta amostra. Foram estocadas em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo meio “Gymp” (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% de NaH₂PO₄ e 2,0% de ágar), para posterior identificação, sendo então cobertas com óleo mineral para evitar ressecamento e mantidas a 8 ± 2°C.

5.10. Provas taxonômicas

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984) e Barnett; Payne; Yarrow (1983, 1990).

A identificação das culturas foi finalizada segundo chaves descritas por Barnett; Payne; Yarrow (1990) e Kurtzman; Fell (1998).

5.11. Provas morfológicas

Para verificação da produção de esporos foram utilizados o meio de cultura de Gorodkova (glicose 0,1%, peptona 1,0%, NaCl 0,5% e ágar 1,8%) e o ágar acetato de McClary (glicose 0,1%, KCl 0,18%, extrato de levedura 0,25%, acetato de sódio 0,82% e ágar 1,8%). As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente e as observações feitas periodicamente entre 7, 14 e 21 dias (KURTZMAN; FELL, 1998).

5.12. Provas fisiológicas

5.12.1. Capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa das culturas foi utilizado o meio básico para fermentação (peptona 0,75% e extrato de levedura 0,5%). O mesmo foi colocado em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo tubo de Durham invertido. Os açúcares, glicose 1,0%, sacarose 2,0%, maltose 1,0% e lactose 1,0% foram esterilizados separadamente do meio de cultura e, posteriormente adicionados.

Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura ambiente, sendo as leituras realizadas entre 24 horas, 7, 14 e 21 dias. Considerando-se resultado positivo quando 1/3 a 3/3 do tubo de Durham estivesse preenchido com gás e negativo quando não houvesse tal produção (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

5.12.2. Desenvolvimento em diversas temperaturas

Foi analisada a capacidade de desenvolvimento a 35, 40 e 45°C, utilizando-se o meio básico para fermentação (peptona 0,75% e extrato de levedura 0,5%) acrescido de 2,0% de glicose. Para a temperatura de 35°C, os tubos de ensaio foram mantidos em estufa de incubação e para as demais foi utilizado o banho-maria. As leituras foram feitas por meio do Cartão de Whickerham (KREEGER VAN RIJ, 1984), após 48-72 horas de incubação. Foi considerado desenvolvimento positivo quando as linhas do cartão não foram visíveis e negativo quando foram visualizadas.

5.12.3. Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato

Utilizou-se o *Yeast Carbon Base* 1,17% (YCB-Difco) contendo 0,078% de KNO_3 como fonte de nitrogênio e 1,8% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

5.12.4. Resistência à pressão osmótica

Neste teste, foram utilizadas duas substâncias distintas. O meio básico para ambas foi o ágar Sabouraud glicose. Para um dos testes, foi acrescentado 50,0% de glicose e para o outro 10,0% de NaCl (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

5.12.5. Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione)

Para esta prova foi empregado o *Yeast Nitrogen Base* 0,67% (YNB-Difco) acrescido de 1,0% de glicose, 1,8% de ágar e alíquotas de cicloheximida que variaram de acordo com a concentração desejada (100 ou 1000 partes por milhão - ppm), segundo metodologia descrita por Kreeger Van Rij (1984).

5.12.6. Síntese de amido

Para a verificação da produção de compostos amilóides foi utilizado o ágar Sabouraud glicose (glicose 2,0%, peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1,8%). Após o desenvolvimento das culturas, foi gotejada sobre as mesmas uma solução de lugol. O aparecimento de coloração azul escura indicou resultado positivo (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

5.12.7. Provas de assimilação de fontes de carbono

Foram usadas as seguintes substâncias: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol), salicina, citrato, m-inositol e glicosamina. Todas

as substâncias foram utilizadas na concentração de 0,5% exceto a rafinose que foi a 1,0%, acrescidas ao *Yeast Nitrogen Base* 0,67% (YNB-Difco) mais 1,8% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

5.13. Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação vigente para produtos lácteos

Para esta prova foi utilizado o ágar Sabouraud glicose, pH = 4,0; onde foram acrescidos os conservantes alimentícios sorbato de potássio (código INS - 202) nas concentrações de 0,015; 0,03; 0,05; 0,06; 0,10; 0,20 e 0,40% e benzoato de sódio (código INS - 211) nas de 0,10; 0,20 e 0,40%. Para verificar o desenvolvimento microbiano foi empregado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de conservante.

Nesta avaliação o pH foi ajustado para 4,0; porque neste valor se obtém uma ótima atividade antimicrobiana dos conservantes empregados. Foram também esterilizados separadamente por autoclavagem, o meio básico (sem ágar), o ágar e os conservantes, para se evitar, em primeiro lugar, a hidrólise do ágar durante o aquecimento, com a perda do poder de gelificação e ainda no que se refere aos conservantes utilizados eventuais perdas por hidrólise ou evaporação.

5.14. Técnica de *Replica-plate*

A técnica de *Replica-plate* foi usada para as provas descritas nos itens 5.11., 5.12.3. a 5.12.7 e 5.13.

Nos testes onde foi utilizado este método, como inóculo, culturas de 24-48 horas em meio Gymp, foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias à temperatura ambiente em *Yeast Nitrogen Base* 0,67% (YNB-Difco) líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema *replica-plate multitiped*, que permite a inoculação de vinte e cinco colônias/placa de Petri (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952; SHEREE LIN; FUNG; COX, 1987).

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 25°C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análises microbiológicas

A Tabela 4 apresenta os resultados após as diferentes análises microbiológicas e a verificação do pH eletrométrico.

Tabela 4. Apresentação dos resultados nas diferentes avaliações.

Bebidas lácteas fermentadas (sabores)	pH	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/mL)	Bolores e leveduras (UFC/mL)	Coliformes (NMP/mL)	Coliformes termotolerantes (NMP/mL)	<i>Escherichia Coli</i> (confirmativo)	<i>Salmonella</i> spp. (-/+)
Marca A							
Ameixa preta	4,10	< 1	0,5 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Coco	4,10	1,8 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	< 3	< 3	-	-
Frutas vermelhas	3,90	3,2 x 10 ¹	3,0 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Mamão com laranja	4,00	< 1	1,0 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Morango	4,10	< 1	< 1	< 3	< 3	-	-
Pêssego	4,10	3,9 x 10 ²	1,8 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	3,90	6,6 x 10 ²	9,7 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Marca B							
Coco	4,10	1,9 x 10 ²	1,3 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Morango	3,90	< 1	1,1 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Pêssego	3,90	8,2 x 10 ³	3,0 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Vitamina: banana, maçã e mamão	4,00	2,5 x 10 ⁰	2,7 x 10 ¹	< 3	< 3	-	-
Marca C							
Coco	4,16	1,6 x 10 ⁸	4,7 x 10 ⁷	< 3	< 3	-	-
Morango	4,18	6,4 x 10 ⁴	5,6 x 10 ⁴	43	15	+	-
Pêssego	4,15	2,1 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁵	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	4,08	2,4 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁵	23	23	+	-
Marca D							
Coco	4,30	3,7 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	1,3 x 10 ¹	2,5 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Pêssego	4,10	1,2 x 10 ²	5,0 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
Marca E							
Coco	4,28	3,6 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁴	1100	15	+	-
Morango	4,76	1,3 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁶	> 1100	> 1100	+	-
Pêssego	4,41	8,3 x 10 ⁴	7,5 x 10 ³	460	15	+	-
Marca F							
Coco	3,97	8,7 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁸	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	< 1	5,0 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	4,00	0,5 x 10 ⁰	4,5 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Marca G							
Mamão, banana e maçã	4,00	2,4 x 10 ²	2,6 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	1,3 x 10 ²	7,5 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
Marca H							
Coco	4,38	5,2 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹	< 3	< 3	-	-
Marca I							
Morango	4,05	< 1	2,0 x 10 ⁰	< 3	< 3	-	-
Marca J							
Morango	3,72	3,8 x 10 ⁸	1,0 x 10 ¹	< 3	< 3	-	-
Marca K							
Morango	4,01	4,2 x 10 ⁶	5,0 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
Marca L							
Morango	4,00	3,9 x 10 ²	2,9 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
	3,72	< 1	< 1	< 3	< 3	-	-
Variação	a	a	a	a	a	- / +	-
	4,76	5,2 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹	> 1100	> 1100		
Padrão Federal (BRASIL, 2001)					Máximo 10/mL		Ausência em 25 mL

Após a obtenção dos resultados, pode-se concluir que, das 31 amostras (100,00%) analisadas, 26 (83,87%) apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor, exceto 5 (16,13%) referentes à Marca C, sabores: salada de frutas e morango, e, à E, sabores: coco, morango e pêssego. Estas apresentaram, para a pesquisa de coliformes termotolerantes, uma variação de 15 a > 1100/mL do produto, uma vez que, a legislação prescreve, para esses microrganismos, o limite máximo de 10/mL do produto.

Quanto a pesquisa de *Salmonella* spp., exigida pelo Padrão Federal (BRASIL, 2001), todas as amostras (100,00%) analisadas apresentaram ausência deste microrganismo em 25 mL, portanto, em acordo com o estabelecido.

Na verificação do pH eletrométrico, as amostras apresentaram uma variação de 3,72 a 4,76, valores estes considerados por muitos estudos como não apropriados para este tipo de produto. Segundo Brandão (1995), valores maiores do que 4,6 favorecem a separação do soro porque a estrutura do gel não foi suficientemente formada. Por outro lado, se o valor do pH estiver abaixo de 4,0 há contração do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, que também causa desoramento, podendo comprometer as características sensoriais do produto, o que não o torna tão atraente aos olhos do consumidor.

Apesar da inexistência de um padrão microbiológico para a enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, o estudo apresentou variações de, respectivamente: < 1 a $5,2 \times 10^9$ e < 1 a $3,7 \times 10^9$ UFC/mL.

Hoffmann, Penna, Vinturim (1998) avaliaram a qualidade e determinaram o pH de diferentes marcas comerciais de bebidas lácteas - sabor morango. Quanto ao pH encontraram valores entre 3,76 a 3,93. Para as análises microbiológicas, verificaram os seguintes resultados: < 1 a $4,4 \times 10^{11}$ UFC/mL para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e < 1 a $8,6 \times 10^2$ UFC/mL para a enumeração de bolores e leveduras. Segundo os mesmos autores, elevadas contagens destes microrganismos podem ser um indício de condições sanitárias deficientes durante o processamento ou utilização de matérias-primas excessivamente contaminadas, podendo comprometer o período de validade do produto. Considerando o padrão em vigor para coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp., (máximo de 10/mL e ausência em 25 mL, respectivamente), todas as amostras apresentaram-se dentro do limite estabelecido pela legislação.

Brandão et al. (2006) declararam que a bebida fermentada probiótica de soro de leite que desenvolveram, se trata de um produto de boa qualidade, ou seja, em conformidade com a legislação, havendo ausência de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Quanto ao pH, encontraram uma variação de 3,8 a 4,2.

Do total de 14 amostras de bebidas lácteas fermentadas avaliadas por Rodrigues e Santos (2007), todas se apresentaram em acordo com o padrão estabelecido para coliformes termotolerantes. Porém, 28,57% das amostras estavam contaminadas por bolores e leveduras. Na determinação do pH, foi encontrada uma variação de 4,0 a 4,6. Os autores também analisaram 39 amostras de iogurtes, constatando a presença de

bolores e leveduras em 53,84% das amostras e a presença de coliformes termotolerantes em 5,13%.

Hoffmann et al. (1997) avaliaram, sob o aspecto higiênico-sanitário, diferentes tipos de iogurte. Não foi constatada a presença de coliformes totais, fecais (*Escherichia coli*) e *Salmonella* spp. Para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, encontraram uma variação, respectivamente, de < 1 a $4,0 \times 10^{13}$ UFC/mL e < 1 a $2,4 \times 10^6$ UFC/mL. Os autores alegam que, apesar de o produto não possuir um padrão para as análises descritas acima, essas foram realizadas para se ter uma noção da quantidade dos microrganismos presentes e da qualidade higiênico-sanitária do produto.

Queiroz et al. (2002) elaboraram um iogurte de leite de búfala e, testaram a sua qualidade microbiológica, por meio das análises: coliformes totais e termotolerantes (fecais), *Salmonella*, bolores e leveduras. Não foi constatada a presença de coliformes e de *Salmonella* nas amostras analisadas, o que demonstra, segundo os autores, condições adequadas para o desenvolvimento do produto. Quanto aos bolores e leveduras, observou-se sua presença em algumas das amostras, porém em valores muito baixos, na ordem de 10 UFC de levedura/g e < 1 UFC de bolores/g. A pequena ocorrência destes microrganismos deve-se principalmente à presença de frutas e adição de açúcar ao derivado.

Longo et al. (2006) realizaram a determinação do pH eletrométrico em amostras de iogurtes naturais que situou-se na faixa de 4,06 a 4,27, diferentemente daquela observada neste estudo.

Lacerda et al. (2001) avaliaram amostras de duas diferentes marcas de iogurtes naturais. A primeira apresentou variação do pH de 4,4 a 4,5 diferentemente da segunda, 3,9 a 4,3. Quanto a pesquisa de bactérias do grupo coliforme, todas as análises apresentaram resultados inferiores a 3 (< 3), portanto, consideradas de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação.

Em um estudo realizado por Silva e Rodrigues (2006) foi relatada a ausência de coliformes totais e de termotolerantes (fecais) em iogurtes aromatizados, considerados, portanto, produtos que atenderam aos padrões legais para o consumo. Na determinação do pH eletrométrico observaram uma variação de 3,87 a 4,17 nas amostras analisadas.

Rocha et al. (2005) avaliaram a qualidade microbiológica de sobremesas lácteas, sabores: goiaba, mangaba e umbu, e constataram ausência de coliformes totais e termotolerantes (fecais), podendo ser consideradas seguras para o consumo, sob o ponto de vista microbiológico.

Com o objetivo de avaliar a incidência de bolores e leveduras, Malagoli, Menezes, Pires (2003) realizaram um estudo no período de 2000 a 2002, onde avaliaram 45 amostras de iogurtes, sabores coco e morango. A prevalência de amostras, com contagens elevadas, para os anos de 2000, 2001 e 2002 foram respectivamente de 81%, 75% e 70%. Os autores alegaram que elevadas contagens de bolores e leveduras acarretam prejuízos para os laticínios, pela diminuição da vida de prateleira do produto, em função de sua deterioração.

Queiroz et al. (2003) analisaram 36 amostras de 3 diferentes marcas comerciais de iogurtes com polpa de morango de 2 partidas distintas

de cada marca, o resultado para a enumeração de coliformes totais foi NMP < 0,3/g, indicando que os produtos estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, portanto aptos para o consumo. Na pesquisa de *Salmonella* spp. foi constatada ausência em todas as amostras analisadas, indicando práticas higiênicas adequadas na elaboração dos produtos.

Menezes et al. (2003) analisaram 346 diferentes amostras de iogurtes, entre janeiro de 1999 e dezembro de 2002. No ano de 1999, de 74 amostras analisadas, 13,51% estavam acima dos padrões legais para coliformes à 45°C. Em 2000, de 178 amostras, 17,98% apresentaram-se fora da legislação. No ano de 2001, de 74 amostras, 9,46% estavam fora do padrão. Em 2002, não foi detectada a presença de termotolerantes nas amostras analisadas. Os dados encontrados pelos autores indicam a necessidade de maiores esforços para a melhoria da qualidade do produto final, por meio de um rigoroso trabalho de inspeção e da conscientização dos produtores sobre os benefícios da adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) para a garantia da segurança dos produtos ao consumidor.

Portanto, é relevante mencionar que a falta de cuidados durante o processamento e/ou ainda do armazenamento, acarreta uma série de inconvenientes; resultado observado em produtos que pecam pela aparência, valor nutritivo e qualidade microbiológica (FREO; REOLON, 2006).

Segundo Macêdo et al. (2000) a temperatura de distribuição e de estocagem é um dos fatores mais importantes na manutenção e conservação de derivados lácteos, por controlar ou inibir o metabolismo de muitos microrganismos, dentre eles os patogênicos, com isso aumentar a vida de prateleira do produto. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de

Bebida Láctea (BRASIL, 2005), define que a bebida láctea deve ser envasada em materiais adequados para as condições de armazenamento e que confirmem uma proteção apropriada contra a contaminação. Quanto às condições de conservação e comercialização, deverão ser conservadas e comercializadas em temperatura não superior a 10°C.

6.2. Isolamento das culturas de leveduras

Das 31 amostras de bebidas lácteas fermentadas, com adição de polpas de frutas analisadas, foram isoladas 74 leveduras, sendo 11 da Marca “A”, 15 da “B”, 31 da “C”, 9 da “E” e 8 da “F”, como ilustra a Tabela 5.

Com relação às leveduras isoladas, a espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* foi a mais numerosa, compreendendo 71 culturas (95,95%), seguida por *Candida edax*, *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii*, compreendendo apenas uma cultura isolada de cada espécie (1,35% cada). As espécies e origens das leveduras estão apresentadas na Tabela 6.

Do total de leveduras isoladas verificou-se que 71 (95,95%), representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, foram designadas para os grupos I e II, como evidencia a Tabela 7. Tal ocorrido se fez necessário, devido a discordâncias de alguns resultados quando relacionados à descrição padrão, resultados estes apresentados na Tabela 8. As leveduras do grupo I diferiram da descrição padrão por assimilarem M-inositol e nitrato (BL 1,2; BL 1,7; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 20,7; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,8). O grupo II diferiu por assimilar

M-inositol e nitrato, e se desenvolver à 40°C (BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,8; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,7; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,11; BL 30,1; BL 30,3; BL 30,10).

A espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* é normalmente encontrada em alimentos ácidos entre eles queijos e molhos (KURTZMAN; FELL, 1998). Segundo Barnett; Payne; Yarrow (2000), esta espécie também pode ser encontrada em carnes, vinhos, cervejas, frutas, solo e água do mar. Tem capacidade de oxidar o ácido acético alterando o sabor do alimento (KURTZMAN; FELL, 1998), por este motivo é considerada uma levedura potencialmente deteriorante.

Na literatura há inúmeros registros correlacionando a ocorrência da espécie *Debaryomyces hansenii* em derivados lácteos. Conforme suscitado por Wyder (2001), *Debaryomyces hansenii* é uma das leveduras mais prevalentes em lácteos. Cosentino et al. (2001) elucidaram propriedades bioquímicas características das *Debaryomyces hansenii*, dentre elas, boa tolerância ao NaCl, habilidade para se desenvolverem em baixas temperaturas e assimilação de lactose, lactato e citrato.

Embora a presença de *Debaryomyces hansenii* esteja diretamente relacionada à assimilação de lactose, Moreira et al. (2001) relataram que há possibilidade de não fermentarem a lactose; tal ocorrido é esclarecido devido a elevadas concentrações de sacarose no produto.

No grupo III está contida a *Candida edax*, (BL 20,16), que diferiu da descrição padrão por assimilar inulina, desenvolver-se em meio contendo 50% de glicose e à temperatura de 40°C.

A *Candida edax* é uma levedura geralmente isolada de solos, no Brasil o isotipo *Stephanoascus smithiae* é comumente encontrado. Trata-se de um microrganismo não fermentativo e não patogênico (KURTZMAN; FELL, 1998). Por se tratar de um microrganismo característico de solos, cogita-se a possibilidade de sua transferência para plantas e delas para os frutos. Uma vez as bebidas lácteas fermentadas sendo acrescidas de polpas de frutas, subentende-se a presença da *Candida edax* por meio de frutos contaminados.

O grupo IV, representado por *Cryptococcus albidus* (BL 6,1), diferiu da descrição padrão por assimilar nitrato, desenvolver-se em meio contendo cicloheximida 100 ppm e ser ascospógeno.

O *Cryptococcus laurentii*, BL 12,2, contido no grupo V, diferiu da descrição padrão por assimilar nitrato, não sintetizar amido e ser ascospógeno.

Estudos relatam o isolamento de *Cryptococcus laurentii* em plantas tropicais, vinhos, água marinha, milho, camarão, solo e ar. É uma espécie não fermentativa, que possui capacidade de desenvolvimento em elevadas concentrações de ácido e sal (KURTZMAN; FELL, 1998).

Como mencionado, existem relatos sobre o isolamento de *Cryptococcus laurentii* em plantas tropicais, portanto há possibilidade de contaminação nas bebidas lácteas fermentadas por meio da adição de polpas de frutas, cujos frutos foram contaminados.

Os dados obtidos neste estudo permitem inferir que, a espécie encontrada em maior frequência foi *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. Moreira et al. (2001) identificaram um total de 577 leveduras, isoladas de 72 amostras de iogurtes. A espécie mais numerosa foi *Debaryomyces hansenii* com 191 (33,10%) das linhagens isoladas.

Inúmeros trabalhos relatam tal espécie como a mais frequentemente encontrada em produtos lácteos. Gusmão (2005), igualmente comprovou a prevalência deste microrganismo, representada por 96,77%, em amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C. Carnicel (2004) relatou a predominância de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, com 97,56%, isoladas de amostras de ricota. Silva (2003) evidenciou o mesmo microrganismo como o mais numeroso, com 54,84% das linhagens isoladas de amostras de queijo tipo “Minas frescal”.

Vijoen et al. (2003) mencionaram as espécies *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Trichosporon beigellii*, *Candida versatilis*, *Cryptococcus albidus*, *Candida zeylanoides* e *Dekkera anomala* como as mais frequentemente isoladas de produtos lácteos.

Assim como este, alguns estudos se utilizaram da taxonomia de leveduras como importante instrumento de identificação da microbiota em questão, além de possibilitar prováveis diagnósticos de contaminação.

Tabela 5. Distribuição das leveduras segundo a origem.

Amostras Marcas	Sabores	Códigos das leveduras	Números das culturas	Porcentagens (n = 74)
"A"	Ameixa preta	BL 6,1; BL 6,2.	2	2,70
	Pêssego	BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13.	8	10,81
	Salada de frutas	BL 12,2.	1	1,35
	Coco	BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9.	6	8,11
"B"	Morango	BL 3,1.	1	1,35
	Vitamina (banana, maçã e mamão)	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12.	8	10,81
	Coco	BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8.	8	10,81
"C"	Morango	BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 20,17.	13	17,57
	Pêssego	BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12.	9	12,16
	Salada de frutas	BL 23,8.	1	1,35
"E"	Coco	BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,8; BL 29,11.	6	8,11
	Pêssego	BL 30,1; BL 30,3; BL 30,10.	3	4,05
"F"	Morango	BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7.	6	8,11
	Salada de frutas	BL 11,1; BL 11,2.	2	2,70

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

Tabela 6. Distribuição das espécies de leveduras segundo as origens.

Espécies	Códigos das leveduras	Números de culturas	Porcentagens (n = 74)
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 23,8; BL 29,8 BL 29,11; BL 30,1; BL 30,3; BL 30,10.	71	95,95
<i>Candida edax</i>	BL 20,16.	1	1,35
<i>Cryptococcus albidus</i>	BL 6,1.	1	1,35
<i>Cryptococcus laurentii</i>	BL 12,2.	1	1,35

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

Tabela 7. Distribuição dos grupos de acordo com a espécie e origem.

Grupos	Espécies	Códigos das leveduras	Números das culturas	Porcentagens (n = 74)
I	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	BL 1,2; BL 1,7; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 20,7; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,8.	24	32,43
II	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,8; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,7; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,11; BL 30,1; BL 30,3; BL 30,10.	47	63,52
III	<i>Candida edax</i>	BL 20,16.	1	1,35
IV	<i>Cryptococcus albidus</i>	BL 6,1.	1	1,35
V	<i>Cryptococcus laurentii</i>	BL 12,2.	1	1,35

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras.

Prova / cultura	BL 1,2	BL 1,3	BL 1,4	BL 1,6	BL 1,7	BL 1,8	BL 1,9	BL 1,12	BL 2,2	BL 2,3	BL 2,4	BL 2,7
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
42°C	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100 ppm	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova / cultura	BL 2,8	BL 2,9	BL 3,1	BL 5,1	BL 5,2	BL 5,3	BL 5,4	BL 5,5	BL 5,7	BL 6,1	BL 6,2	BL 10,1	BL 10,6
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Cicloheximida 100 ppm	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
NaCl 10%	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova / cultura	BL 10,7	BL 10,8	BL 10,10	BL 10,11	BL 10,12	BL 10,13	BL 11,1	BL 11,2	BL 12,2
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	-
40°C	+	-	-	-	-	-	+	+	-
42°C	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova / cultura	BL 20,1	BL 20,4	BL 20,5	BL 20,6	BL 20,7	BL 20,8	BL 20,10	BL 20,11	BL 20,13	BL 20,14
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova / cultura	BL 20,15	BL 20,16	BL 20,17	BL 21,1	BL 21,2	BL 21,3	BL 21,4	BL 21,5	BL 21,6	BL 21,10
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
42°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova / cultura	BL 21,11	BL 21,12	BL 22,1	BL 22,2	BL 22,3	BL 22,4	BL 22,5	BL 22,6	BL 22,7	BL 22,8
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
40°C	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
42°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 8. Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova / cultura	BL 23,8	BL 29,4	BL 29,5	BL 29,6	BL 29,7	BL 29,8	BL 29,11	BL 30,1	BL 30,3	BL 30,10
Colônias <i>pink</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
42°C	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

6.3. Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação vigente para produtos lácteos

Segundo a legislação brasileira não é permitida a adição intencional de substâncias conservantes, embora admitir-se-á a presença dos aditivos transferidos por meio dos ingredientes opcionais em conformidade com o princípio de transferências de aditivos alimentares, de acordo com a Portaria nº. 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 (DOU de 28/10/97). A concentração no produto final não deverá superar a proporção que corresponda à concentração máxima admitida no ingrediente opcional (BRASIL, 2005).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005) preconiza o limite máximo do conservante sorbato de potássio na concentração de 0,03% no produto final. Na legislação vigente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO - ABIA, 2003) os limites máximos permitidos, para o mesmo conservante, são nas concentrações de 0,10 e 0,20% e para o benzoato de sódio na de 0,20% no produto final. Orientando-se a partir dos parâmetros limites exigidos, citados anteriormente, este estudo constatou *in vitro* o comportamento das leveduras frente às concentrações, portanto mencionadas, assim como à metade e o dobro dos valores permitidos.

Sendo assim, as 74 leveduras isoladas foram testadas frente aos conservantes alimentícios nas diferentes concentrações: benzoato de sódio, nas concentrações de 0,10; 0,20 e 0,40% e sorbato de potássio nas de 0,015; 0,03; 0,05; 0,06; 0,10; 0,20 e 0,40%.

6.3.1. Benzoato de sódio

Os resultados nos ensaios com o conservante benzoato de sódio permitem inferir que das linhagens isoladas, quando na presença do conservante na concentração de 0,10%, observou-se o desenvolvimento de 62, isto é, 83,78% do total isolado. Para as de 0,20 e 0,40%, tais microrganismos não apresentaram diferenças quanto ao seu desenvolvimento, onde 37, ou seja, 50,00% deles se desenvolveram para ambas as concentrações testadas. As leveduras e seus respectivos percentuais de desenvolvimento estão disponíveis na Tabela 9.

Seguindo a mesma temática, Coelho (2001) e Fazio (2006) testaram a ação antimicrobiana deste conservante sobre leveduras. Nas concentrações de 0,10 e 0,20%, Coelho (2001) observou desenvolvimento respectivamente, em 0,83 e 0,00% nas leveduras testadas, enquanto que Fazio (2006) constatou 0,00% de culturas resistentes para ambas as concentrações. Valores estes, inferiores aos encontrados neste estudo.

Carnicel (2004) relatou desenvolvimento em 74,39; 65,86 e 32,93% das linhagens isoladas, quando submetidas respectivamente, às concentrações de 0,10; 0,20 e 0,40%. Nas mesmas concentrações, Gusmão (2005) verificou respectivamente, 85,42; 77,08 e 39,58% de leveduras resistentes a este conservante.

Com relação às espécies, *Cryptococcus albidus* (BL 6,1), e *Cryptococcus laurentii* (BL 12,2), não resistiram ao conservante benzoato de sódio em todas as concentrações as quais foram submetidas (0,10; 0,20 e 0,40%). A espécie *Candida edax* (BL 20,16) apresentou capacidade de

desenvolvimento em todas as concentrações testadas. Da espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, um total de 71 culturas (95,95%) foram isoladas, onde 61 (82,44%) resistiram à concentração de 0,10% e 36 (48,65%), resistentes às de 0,20% e 0,40%.

Segundo Fleet; Mian (1987), *Debaryomyces hansenii* possui alta resistência aos conservantes sorbato e benzoato, o que pode explicar as altas percentagens desse microrganismo observadas neste estudo.

Tabela 9. Leveduras resistentes ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.

Concentrações (%)	Códigos das culturas	Números das culturas	Porcentagens (n = 74)
0,10	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,4; BL 29,11.	62	83,78
0,20	BL 1,2; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,4; BL 2,7; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 20,7; BL 20,13; BL 20,16; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8.	37	50,00
0,40	BL 1,2; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,4; BL 2,7; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 20,7; BL 20,13; BL 20,16; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8.	37	50,00

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

6.3.2. Sorbato de potássio

Com relação ao conservante sorbato de potássio, nas concentrações de 0,015 e 0,03%, observou-se desenvolvimento de 72, isto é (97,30%), dos microrganismos isolados. Nas de 0,05 e 0,06%, constatou-se que 70 (94,60%) das leveduras testadas se desenvolveram. Para a de 0,10%, verificou-se desenvolvimento em 66, ou seja, (89,19%) do total isolado. Na de 0,20%, 48 (64,86%) delas se desenvolveram. E, para a de 0,40%, observou-se desenvolvimento em 14 (18,92%) das linhagens isoladas. Valores estes e suas respectivas leveduras elucidadas na Tabela 10.

Gusmão (2005) observou capacidade de desenvolvimento de 93,33% das culturas isoladas, quando submetidas às concentrações de 0,10; 0,20 e 0,40%. Nas mesmas concentrações, Carnicel (2004) verificou resistência, respectivamente, em 18,29; 37,80 e 47,56% do total de microrganismos isolados.

Em estudo realizado por Coelho (2001), nas concentrações de 0,10 e 0,20%, observou-se resistência em 0,42 e 0,00% das linhagens isoladas.

Com relação as espécies, *Cryptococcus albidus* (BL 6,1) e *Cryptococcus laurentii* (BL 12,2) não se desenvolveram na presença deste conservante em todas as concentrações as quais foram submetidas (0,015; 0,03; 0,05; 0,06; 0,10; 0,20 e 0,40%). A *Candida edax* (BL 20,16) apresentou capacidade de desenvolvimento em todas as concentrações, exceto na de 0,40%. Das culturas isoladas referentes à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, todas (95,95%) demonstraram capacidade de desenvolvimento às

concentrações de 0,015 e 0,03. Nas de 0,05 e 0,06%, 69 (93,25%) apresentaram resistência. Enquanto que, nas de 0,10; 0,20 e 0,40%, as linhagens isoladas que apresentaram capacidade de desenvolvimento foram, respectivamente de, 65 (87,84%), 47 (63,52%) e 14 (18,92%) culturas.

Tabela 10. Leveduras resistentes ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas.

Concentrações (%)	Códigos das culturas	Números das culturas	Porcentagens (n = 74)
0,015	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,8; BL 29,11; BL 30,1; BL 30,3; BL 30,10.	72	97,30
0,03	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,8; BL 29,11; BL 30,1; BL 30,3; BL 30,10.	72	97,30
0,06	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,8; BL 29,11; BL 30,1.	70	94,60

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada. (continua)

Tabela 10. Leveduras resistentes ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas (continuação).

Concentrações (%)	Códigos das culturas	Números das culturas	Porcentagens (n = 74)
0,05	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,4; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 20,17; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,6; BL 29,7; BL 29,8; BL 29,11; BL 30,1.	70	94,60
0,10	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,3; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 6,2; BL 10,1; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 10,13; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,1; BL 20,4; BL 20,5; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,10; BL 20,11; BL 20,13; BL 20,14; BL 20,15; BL 20,16; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 21,5; BL 21,6; BL 21,10; BL 21,11; BL 21,12; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 23,8; BL 29,4; BL 29,5; BL 29,7; BL 29,8; BL 29,11.	66	89,19
0,20	BL 1,2; BL 1,3; BL 1,6; BL 1,7; BL 1,8; BL 1,9; BL 1,12; BL 2,2; BL 2,4; BL 2,7; BL 2,8; BL 2,9; BL 3,1; BL 5,1; BL 5,2; BL 5,3; BL 5,4; BL 5,5; BL 5,7; BL 10,6; BL 10,7; BL 10,8; BL 10,10; BL 10,11; BL 10,12; BL 11,1; BL 11,2; BL 20,6; BL 20,7; BL 20,8; BL 20,13; BL 20,16; BL 21,1; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 29,7; BL 29,8.	48	64,86
0,40	BL 20,13; BL 21,2; BL 21,3; BL 21,4; BL 22,1; BL 22,2; BL 22,3; BL 22,4; BL 22,5; BL 22,6; BL 22,7; BL 22,8; BL 29,7; BL 29,8.	14	18,92

Legenda: BL_{n,n1} onde: BL = Bebida láctea fermentada com adição de polpas de frutas; n = Número da amostra; n1 = Número da levedura isolada.

7. CONCLUSÕES

Os resultados permitem inferir que, 16,13% das amostras (100,00%) avaliadas apresentaram-se acima do padrão microbiológico preconizado pela legislação vigente em um dos parâmetros, sendo por este motivo, classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” e, por conseguinte “produtos impróprios para o consumo humano”.

Com relação às leveduras isoladas, a espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* foi a mais numerosa, compreendendo 95,95% do total (100,00%) isolado, seguida por *Candida edax*, 1,35%, *Cryptococcus albidus*, 1,35% e *Cryptococcus laurentii*, 1,35%.

As informações obtidas neste estudo permitem inferir que elevadas contagens de microrganismos deteriorantes podem ser um indicio de condições sanitárias deficientes durante o processamento ou utilização de matérias-primas excessivamente contaminadas, podendo comprometer o período de validade do produto. Tal situação permite concluir que, medidas de prevenção, higiene e controle devem ser rigorosamente adotadas, desde a seleção das matérias-primas bem como, em todas as etapas do processamento até a estocagem e distribuição do produto.

A partir dos testes de resistência aos principais conservantes alimentícios é possível concluir que, as concentrações de 0,20% de benzoato de sódio e 0,40% de sorbato de potássio foram as mais eficazes, representando respectivamente, 50,00% e 18,92% de culturas resistentes à presença dos conservantes testados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e de derivados**. Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado. Lavras: FAEPE, 2000. 205 p. [Apostila].

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 1997. 464 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Technical committee on microbiological methods for foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 2. ed. Washington: Speck, 1992. 1219 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO - ABIA - Compêndio da Legislação e Alimentos - **Consolidação das mesmas e padrões de alimentos - Atos do Ministério da Saúde**. Revisão 9., v. 1/A, p. 3.76-3.82, 2003.

ARAÚJO, W. N. et al. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador - Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produto Animal**, v. 2, n. 1, p. 10-14, 2001.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 881 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1002 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1020 p.

BIROLLO, G. A.; REINHEIMER, J. A.; VINDEROLA, C. G. Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. **Food Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 597-604, dec., 2001.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção de iogurte. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 4, n. 25, p. 24-38, 1995.

BRANDÃO, S. C. C. **Tecnologia da produção industrial de iogurtes**. In: SEMANA DO LATICINISTA - INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES, Juiz de Fora, 1997. p. 52-58. [Apostila].

BRANDÃO, W. A. P. L. N. T. M. et al. Bebida fermentada probiótica de soro de leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 143, p. 56-59, agost., 2006.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução normativa nº. 16 de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, 24 de agosto de 2005.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC n°. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001, seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003, Seção 1, p. 4.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I. Métodos microbiológicos**. Brasília, 1981.

CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; ANDRADE, N. J. Levantamento das condições de processamento em micro-indústrias de leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 137, p. 25-28, nov./dez., 2005.

CARNICEL, F. A. **Qualidade microbiológica de ricota e estudos de resistência de leveduras do gênero *Debaryomyces* isoladas de produtos lácteos**. 2004. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.

CHIPLEY, J. R. Sodium Benzoate and Benzoic Acid. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in Foods**. New York: Marcel Dekker, 1993. Cap. 2, p. 11-48.

COELHO, A. R. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de sorvetes**. 2001. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

COSENTINO, S. et al. Yeasts associated with sardinian ewe's dairy products. International. **Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1/2, p. 53-58, 2001.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 652 p.

FAZIO, M. L. S. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

FERREIRA, A. C. Breve história e perspectivas para a indústria de laticínios no Brasil. In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA E PRODUTOS LÁCTEOS GERMINAL. **Anais...**, 2002. p. 23-30.

FERREIRA, A. C. Evolução e realidade da indústria de laticínios no Brasil. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 12, n. 74, p. 80-82, 2003.

FERREIRA, A. C. Tendências mercadológicas de produtos lácteos fermentados e bebidas lácteas. **Leites fermentados e bebidas lácticas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, 1997. p. 7.21-7.40. [Apostila].

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 199-211, mar., 1990.

FLEET, G. H. MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 145-155, 1987.

FLORENTINO, E. R. et al. Caracterização do soro de queijo visando processo de aproveitamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 130, p. 30-32, abr., 2005.

FREO, J. D.; REOLON, J. Qualidade dos produtos derivados de carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 53-59, abr., 2006.

FURTADO, S. M. P. Estabilizantes empregados em leites fermentados e bebidas lácticas. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, 1997. p. 7.45-7.50. [Apostila].

GIRALDO-ZUÑIGA, A. D. et al. Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 340-341, p. 53-66, set./dez., 2004.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GOMES, R. G. **Efeitos dos teores de leite, soro e proteínas de soja nas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas**. 2005. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista São José do Rio Preto, 2005.

GRAN, H. M. et al. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: the production of fermented milk products with particular emphasis on sanitation and microbiological quality. **Food Control**, v. 13, n. 1, p. 41-47, jan., 2002.

GUEDES NETO, L. G. et al. Defeitos tecnológicos de leites fermentados. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 12, n. 74, p. 29-35, 2003.

GUSMÃO, V. V. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em leite pasteurizado tipos A, B e C.** 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.

HARPER, W. J. Functional properties of whey protein concentrates and their relationship to ultrafiltration. **International Dairy Federation. New Applications of Membrane Processes**, n. 9201, p. 77-109, 1992.

HARRIGAN, W. F.; MC CANCE, M. E. **Laboratory methods in food dairy microbiology.** Academic Press, New York, London-San Francisco, 1976, 353 p.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, n. 9, jul./agost., 2001.

HOFFMANN, F. L. et al. Estudo higiênico-sanitário de diferentes tipos de iogurte. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - B.CPEPA**, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 187-196, jul./dez., 1997.

HOFFMANN, F. L.; PENNA, A. L. B.; VINTURIM, T. M. Avaliação da qualidade de diferentes marcas comerciais de bebidas lácteas - sabor morango. In: XV CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. **Anais...**, 1998. v. 53, n. 304, p. 94-101.

HUGUNIN, A. O uso de produtos de soro em iogurte e produtos lácteos fermentados. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 9, n. 49, p. 22-33, 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration.** 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978, 434 p., v. 1.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbial ecology of foods.** New York: Academic Press, 1980, 997 p., v. 2.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology.** New York: Chapman & Hall, 1996.

KIMBLE, C. H. Chemical Food Preservatives. In: BLOCK, S. S. **Desinfection, sterilization and preservation.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1977, Cap. 41, p. 834-858.

KREEGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam: Elsevier Science, 1984, 1082 p.

KURMANN, J. A. Os fatores biológicos e técnicos da fabricação do iogurte. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. In: XV SEMANA DO LATICINISTA - EPAMIG / CT / ILCT, **Anais...**, 1977. p. 74-84.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomy study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1998, 1005 p.

LACERDA, T. H. M. et al. Avaliação de possíveis mudanças em iogurtes naturais comercializados em Piracicaba, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 71-76, set., 2001.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 63, p. 399-406, 1952.

LIMA, S. M. C. G. **Desenvolvimento de uma Bebida Láctea à Base de Soro de Queijo, Fortificada com Ferro**. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

LIMA, S. M. C. G.; MADUREIRA, F. C. P.; PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas nutritivas e refrescantes. **Revista Milkbizz Tecnologia Temático**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 4-11, 2002.

LONGO, G. et al. Avaliação da qualidade físico-química de iogurtes naturais comercializados na cidade de Curitiba, Paraná. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 138, p. 56-59, jan./fev., 2006.

LUCEY, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 282-294, 2002.

LUCK, E. **Conservación química de los alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 1977.

MACÊDO, J. A. B. et al. Avaliação da temperatura de refrigeração nas gôndolas de exposição de derivados lácteos em supermercados da região de Juiz de Fora/MG. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 9, n. 53, p. 20-30, 2000.

MADUREIRA, F. C. P. **Desenvolvimento de uma bebida láctea funcional**. 2004. 173 f. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista São José do Rio Preto, 2004.

MAGALHÃES, M. M. A. et al. Elaboração e caracterização de sobremesas lácteas a base de frutas tropicais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 12-15, jun., 2005.

MALAGOLI, P. J.; MENEZES, L. D. M.; PIRES, L. L. Prevalência de bolores e leveduras em iogurtes inspecionados pelo serviço de inspeção estadual de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 105, jan./fev., 2003.

MANZIONE JR., S. Laticínios, um mercado em expansão. **Indústria de Laticínios**, v. 1, n. 1, p. 12-14, 1996.

MARTH, E. E. **Standard methods for the examination of dairy products**. 14. ed. Washington: APHA, 1978, 416 p.

MENEZES, L. D. M. et al. Prevalência de coliformes à 45°C em iogurtes inspecionados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária nos anos de 1999 a 2002. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 119, jan./fev., 2003.

MOREIRA, S. R. et al. Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 117-122, 2001.

NEVES, B. S. Elaboração de bebidas lácteas à base de soro. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 2, n. 10, p. 50-54, 1993.

NICOLAU, A. E. A.; OLSEN, S. Tendências e demandas tecnológicas em estabilização de fermentados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 89-91, 2002.

NIELSEN, A. C. Tendência do mercado de iogurtes e bebidas lácteas: evolução dos segmentos. In: LERAYER, A. L. S., SALVA, T. J. G., coords. **Leites fermentados e bebidas lácteas**. Campinas: ITAL. 1997. p. 2.11-2.25

PEREIRA, M. A. G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no processo de acidificação e pós-acidificação de iogurte**. 2002, 174f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

QUEIROZ, A. M. P. et al. Avaliação da Qualidade de iogurtes com polpa de morango comercializados em Porto Alegre - RS. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 158, jan./fev., 2003.

QUEIROZ, L. S. O. et al. Avaliação microbiológica de iogurte de leite de búfala, com sabor de frutas da Amazônia, para merenda escolar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 94, p. 39-44, mar., 2002.

RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. **Yoghurt: scientific grounds, technology, manufacture and preparations**. Switzerland: Staempfli & Cie AG, 1978, 423 p.

REIS, G. L. Sistema de gestão ambiental em laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 35-47, mai./jun., 1999.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 304, p. 67-69, mai./jun., 1997.

ROBACH, M. C. Use of preservatives to control microorganisms in food. **Food Technology**, v. 34, n. 10, p. 81-84, 1980.

ROCHA, E. M. et al. Análise sensorial e estudo da vida de prateleira de sobremesas lácteas à base de frutas tropicais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 28-33, set., 2005.

RODRIGUES, M. A. M.; SANTOS, K. A. Qualidade microbiológica de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, comercializadas em Uberlândia / MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 150, p. 39-40, 2007.

ROGINSK, H. Fermented Milks. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 43, n. 2, p. 37-46, 1988.

SABOYA, I. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 44-50, 2001.

SCHULZE, J. C. M.; FERNANDES, M. N. A importância da higiene em indústrias de alimentos. **Revista Nacional da Carne**, n. 247, p. 62-67, 1997.

SEIBEL, N. F.; CANSIAN, R. L. Análise de diferentes concentrações de soro na produção de bebida láctea. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 9, n. 52, p. 44-49, 2000.

SHEREE LIN, C. C.; FUNG, D. Y. C.; COX, N. A. Conventional and rapid methods for yeasts identification. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 273-289, 1987.

SILVA, G. S.; RODRIGUES, M. A. M. Avaliação da qualidade de iogurte aromatizado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 82-85, abr., 2006.

SILVA, J. V. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo tipo "Minas frescal"**. 2003. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Microbiologia de alimentos**. Campinas: Varela. 1997.

SISO, M. I. G. The biological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SOFOS, J. N. **Antimicrobial agents**. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. Food Additive Toxicology. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 501-529.

SURIYARACHCHI, V. R.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of yeasts in yogurts. **Applied Environment Microbiological**, v. 42, p. 574-579, 1981.

TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 43, n. 12, p. 939-971, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciência y tecnologia**. Zaragoza: Acríbia, 1991, 368 p.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Conservantes ácido benzóico e ácido sórbico - uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 35, n. 1/2, p. 41-53, 2001.

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

THATCHER, F. S.; CLARK, D. S. **Análisis microbiológico de los alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 1973.

UNITED STATE DAIRY EXPORT COUNCIL - USDEC. **Manual de Referência para Produtos de Soro dos Estados Unidos**. São Paulo: USDEC, 2004.

VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M. Efeitos benéficos do uso de soro de leite na alimentação. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 85-91, 2006.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química e microbiología**. Zaragoza: Acríbia, 1994, p. 365-380.

VIJOEN, B. C. et al. Development of yeast populations during processing and ripening of blue veined cheese. **Food Technology and Biotechnology**, n. 41, p. 291-297, 2003.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic in Argentina yogurts during refrigerate storage. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.

WALSTRA, P. et al. **Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes**, 1999, 537 p.

WYDER, M. T. Yeasts in Dairy Products. **Federal Dairy Research Station Liebfeld**, n. 425, p. 1-21, 2001. Disponível em: <<http://www.admin.ch/sar/farm>> Acesso em: 27 de Dezembro de 2007.