

**JANAÍNA ALVES DOS REIS**

**Bebidas lácteas fermentadas: evolução da microbiota durante a  
fabricação, identificação de fungos leveduriformes e ação de  
culturas probióticas sobre os leveduriformes**

JANAÍNA ALVES DOS REIS

**Bebidas lácteas fermentadas: evolução da microbiota durante a fabricação, identificação de fungos leveduriformes e ação de culturas probióticas sobre os leveduriformes**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus São Jose do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Barretto Penna  
UNESP - São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarete Teresa Gottardo de Almeida  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto -  
FAMERP

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Conti e Silva  
UNESP - São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Landi Franco  
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de junho de 2012.

Reis, Janaína Alves dos.

Bebidas lácteas fermentadas: evolução da microbiota durante a fabricação, identificação de fungos leveduriformes e ação de culturas probióticas sobre os leveduriformes / Janaína Alves dos Reis. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

155 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. Bebidas lácteas. 4. Leite fermentado. 5. Probiótico. 6. Levedos. I. Penna, Ana Lúcia Barretto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 637.141.8

**Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor, Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir.**

**Cora Coralina**

***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...*

*Ao meu noivo José Flávio, pela compreensão e pelo apoio...*

*....a minha eterna gratidão !*

## **Os meus mais sinceros agradecimentos ...**

*À minha orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna, pela confiança, paciência, apoio, mas principalmente por me ajudar a realizar um sonho !*

*Ao meu orientador de Mestrado Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pelo incentivo e dedicação (desde o segundo ano de minha Graduação) e por ter me proporcionado crescimento acadêmico e pessoal;*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro;*

*À Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida e à Natalia Seron Brizzotti Mazuchi pela colaboração e auxílio na identificação dos fungos leveduriformes;*

*A todos os professores do curso de Pós-Graduação e aos funcionários e técnicos de laboratório;*

*A 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. Maria Astride Saad Corradi, Valéria Stranghetti, Eliana Rosa de Palma Fernandez, Lílian Castiglioni, Kátia Regina Penteado Mandrá, Zélia Aparecida Valsechi da Silva;*

*Às minhas companheiras de laboratório e amigas, Tatiane, Grazielle, Íris, Luana, Vivian, Renata, Marília, Priscila, Raquel e principalmente às minhas amigas Ana Beatriz e Aline, que se fizeram presentes a cada dia com alegria, cumplicidade, apoio e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis. A vocês Line e Bia, a minha mais profunda amizade !*

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

*Aos meus queridos primos de coração Gláucia e Júnior e as nossas princesas Mariana e Marina, pelo carinho e apoio constantes;*

*Ao meu noivo José Flávio e seus pais Maria Fátima e Norberto, pelo amor, paciência, apoio e incentivo constantes, por estarem ao meu lado e me proporcionarem momentos felizes;*

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

*Aos meus pais José Carlos e Maria Elisabeth e ao meu irmão Neto, pelo amor, paciência, dedicação, mas principalmente pela compreensão;*

*À minha tia Maria Aparecida e 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 12 anos juntas... À você Nina, minha melhor amiga, minha eterna admiração, respeito e amor !*

## SUMÁRIO

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| <b>RESUMO GERAL .....</b>     | <b>1</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>         | <b>3</b> |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b> | <b>5</b> |

### **CAPÍTULO I**

|                                                                                              |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Revisão bibliográfica .....</b>                                                           | <b>7</b> |
| 1 - Qualidade em indústrias alimentícias .....                                               | 8        |
| 1.1 - Ferramentas para a gestão da qualidade .....                                           | 9        |
| 1.1.2 - Higienização como ferramenta de gestão da qualidade em indústrias laticinistas ..... | 14       |
| 2 - Bebidas lácteas fermentadas .....                                                        | 15       |
| 3 - Alimentos probióticos .....                                                              | 22       |
| 3.1 - Bactérias probióticas .....                                                            | 25       |
| 3.1.1 - Gênero <i>Bifidobacterium</i> .....                                                  | 28       |
| 3.1.2 - Gênero <i>Lactobacillus</i> .....                                                    | 29       |
| 3.1.2.1 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....                                             | 30       |
| 3.1.2.2 - <i>Lactobacillus casei</i> .....                                                   | 31       |
| 4 - Fungos leveduriformes .....                                                              | 32       |
| 4.1 - <i>Cryptococcus albidus</i> e <i>Cryptococcus laurentii</i> .....                      | 34       |
| 4.2 - <i>Candida edax</i> .....                                                              | 34       |
| 4.3 - <i>Debaryomyces hansenii</i> .....                                                     | 35       |
| 5 - Considerações finais .....                                                               | 36       |
| 6 - Referências bibliográficas .....                                                         | 36       |

### **CAPÍTULO II**

|                                                                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Relação entre implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a evolução da microbiota na fabricação de bebidas lácteas fermentadas .</b> | <b>50</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                                                             | <b>51</b> |
| 1 - Introdução .....                                                                                                                            | 52        |
| 2 - Materiais e métodos .....                                                                                                                   | 54        |
| 2.1 - Avaliação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) nos laticínios produtores de bebidas lácteas fermentadas .....                            | 54        |
| 2.2 - Obtenção e preparo das amostras .....                                                                                                     | 54        |
| 2.3 - Caracterização microbiológica das amostras .....                                                                                          | 57        |
| 2.3.1 - Contagem total de bactérias lácticas no produto acabado .....                                                                           | 57        |
| 2.3.2 - Enumeração de fungos leveduriformes .....                                                                                               | 57        |
| 2.4 - Caracterização físico-química das amostras do laticínio B .....                                                                           | 58        |
| 3 - Resultados e discussão .....                                                                                                                | 58        |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 - Avaliação das BPF nos laticínios produtores de bebidas lácteas .....   | 58 |
| 3.2 - Caracterização microbiológica das amostras .....                       | 64 |
| 3.2.1 - Viabilidade da microbiota láctica .....                              | 64 |
| 3.2.2 - Enumeração de fungos leveduriformes .....                            | 66 |
| 3.3 - Caracterização físico-química das amostras coletadas no laticínio B .. | 71 |
| 4 - Conclusão .....                                                          | 72 |
| 5 - Referências bibliográficas .....                                         | 72 |

### **CAPÍTULO III**

#### **Evolução de fungos leveduriformes isolados durante o processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas .....**

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMO .....                                                                            | 87  |
| 1 - Introdução .....                                                                    | 88  |
| 2 - Materiais e métodos .....                                                           | 89  |
| 2.1 - Obtenção e preparo das amostras .....                                             | 89  |
| 2.2 - Isolamento e manutenção das culturas leveduriformes .....                         | 90  |
| 2.2.1 - Provas taxonômicas .....                                                        | 91  |
| 2.2.1.1 - Provas morfológicas .....                                                     | 92  |
| 2.2.1.1.1 - Microcultivo .....                                                          | 92  |
| 2.2.1.1.2 - Produção de esporos .....                                                   | 92  |
| 2.2.1.2 - Provas fisiológicas .....                                                     | 92  |
| 2.2.1.2.1 - Capacidade fermentativa .....                                               | 92  |
| 2.2.1.2.2 - Desenvolvimento em diversas temperaturas .....                              | 93  |
| 2.2.1.2.3 - Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato .....                   | 93  |
| 2.2.1.2.4 - Resistência à pressão osmótica .....                                        | 93  |
| 2.2.1.2.5 - Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione) ..... | 93  |
| 2.2.1.2.6 - Síntese de amido .....                                                      | 94  |
| 2.2.1.2.7 - Provas de assimilação de fontes de carbono .....                            | 94  |
| 2.2.1.2.8 - Teste de urease .....                                                       | 94  |
| 2.2.2 - Técnica de <i>Replica-plate</i> .....                                           | 95  |
| 3 - Resultados e discussão .....                                                        | 95  |
| 3.1 - Testes morfológicos e fisiológicos .....                                          | 96  |
| 3.1.1 - Fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no laticínio A .....      | 107 |
| 3.1.2 - Fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no laticínio B .....      | 108 |
| 4 - Conclusão .....                                                                     | 113 |
| 5 - Referências bibliográficas .....                                                    | 113 |

## CAPÍTULO IV

### Comportamento *in vitro* e *in situ* de culturas probióticas sobre micro-organismos leveduriformes .....

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMO .....                                                                                                                  | 118 |
| 1 - Introdução .....                                                                                                          | 120 |
| 2 - Materiais e métodos .....                                                                                                 | 121 |
| 2.1 - Culturas de bactérias probióticas .....                                                                                 | 121 |
| 2.1.1 - Viabilidade das culturas probióticas .....                                                                            | 122 |
| 2.1.2 - Preparo do sobrenadante livre de células (SLC) e do sobrenadante livre de células concentrado (SLCC) .....            | 123 |
| 2.2 - Culturas de fungos leveduriformes .....                                                                                 | 123 |
| 2.2.1 - Viabilidade das culturas leveduriformes .....                                                                         | 124 |
| 2.3 - Planejamento dos experimentos .....                                                                                     | 124 |
| 2.4 - Comportamento antagonista <i>in vitro</i> .....                                                                         | 125 |
| 2.5 - Comportamento antagonista <i>in situ</i> .....                                                                          | 126 |
| 2.5.1 - Preparação da bebida láctea fermentada .....                                                                          | 126 |
| 2.5.2 - Avaliação da bebida láctea fermentada .....                                                                           | 127 |
| 2.5.2.1 - Análises físico-químicas .....                                                                                      | 127 |
| 2.5.2.2 - Análises microbiológicas .....                                                                                      | 127 |
| 2.5.3 - Avaliação da bebida láctea fermentada durante a vida de prateleira .....                                              | 129 |
| 2.6 - Análise estatística dos resultados experimentais .....                                                                  | 129 |
| 3 - Resultados e discussão .....                                                                                              | 129 |
| 3.1 - Comportamento <i>in vitro</i> dos cultivos probióticos sobre os leveduriformes .....                                    | 129 |
| 3.1.1 - Diferentes densidades populacionais das culturas probióticas ..                                                       | 129 |
| 3.1.2 - Sobrenadante livre de células (SLC) e sobrenadante livre de células concentrado (SLCC) das culturas probióticas ..... | 132 |
| 3.1.2.1 - Interação positiva com culturas de <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i> .....                           | 135 |
| 3.2 - Comportamento <i>in situ</i> dos cultivos probióticos sobre os fungos leveduriformes .....                              | 139 |
| 3.2.1 - Caracterização físico-química .....                                                                                   | 139 |
| 3.2.2 - Caracterização microbiológica .....                                                                                   | 146 |
| 3.2.2.1 - Viabilidade das culturas probióticas .....                                                                          | 146 |
| 3.2.2.2 - Viabilidade das culturas leveduriformes .....                                                                       | 149 |
| 4 - Conclusão .....                                                                                                           | 150 |
| 5 - Referências bibliográficas .....                                                                                          | 151 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

#### Revisão bibliográfica

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas ..... | 18 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO II

#### Relação entre implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a evolução da microbiota na fabricação de bebidas lácteas fermentadas

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas e etapas nas quais as amostras foram coletadas nos laticínios A e B ..... | 56 |
| <b>Figura 2</b> - Viabilidade média das BAL nas amostras de bebidas lácteas dos laticínios A e B, durante a estocagem refrigerada .....                         | 65 |
| <b>Figura 3</b> - Variações populacionais de fungos leveduriformes nas amostras coletadas no laticínio A .....                                                  | 67 |
| <b>Figura 4</b> - Variações populacionais de fungos leveduriformes nas amostras coletadas no laticínio B .....                                                  | 68 |

### CAPÍTULO IV

#### Comportamento *in vitro* e *in situ* de culturas probióticas sobre microrganismos leveduriformes

|                                                                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1</b> - Planejamento experimental para o estudo do comportamento antimicrobiano <i>in vitro</i> , em duplicata .....                                               | 125 |
| <b>Figura 2</b> - Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas .....                                                                                  | 128 |
| <b>Figura 3</b> - Ensaio com diferentes densidades populacionais da cultura probiótica sobre <i>Candida edax</i> . a) Bb-12, b) La-5, c) Lc-1 .....                          | 131 |
| <b>Figura 4</b> - Ensaio com o SLC e o SLCC da cultura probiótica Bb-12 sobre os fungos leveduriformes. a) <i>Cryptococcus albidus</i> , b) <i>Cryptococcus laurentii</i> .. | 133 |
| <b>Figura 5</b> - Ensaio com o SLC e o SLCC da cultura probiótica La-5 sobre <i>Cryptococcus albidus</i> .....                                                               | 134 |
| <b>Figura 6</b> - Ensaio com o SLC e o SLCC da cultura probiótica Lc-1 sobre os fungos leveduriformes. a) <i>Cryptococcus albidus</i> , b) <i>Cryptococcus laurentii</i> ..  | 135 |

|                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 7</b> - Formação de halos de interação positiva, representando o intenso desenvolvimento de <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i> na presença do SLC e do SLCC. a) Bb-12, b) La-5 e c) Lc-1 ..... | 137 |
| <b>Figura 8</b> - Curvas de acidificação das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Bb-12 .....                                                                                                                      | 144 |
| <b>Figura 9</b> - Curvas de acidificação das bebidas lácteas fermentadas pela cultura La-5 .....                                                                                                                       | 145 |
| <b>Figura 10</b> - Curvas de acidificação das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Lc-1 .....                                                                                                                      | 145 |
| <b>Figura 11</b> - População de Bb-12 em bebidas lácteas controle e adicionadas de <i>C. albidus</i> e <i>C. laurentii</i> , durante a estocagem refrigerada .....                                                     | 147 |
| <b>Figura 12</b> - População de La-5 em bebidas lácteas controle e adicionada de <i>C. albidus</i> , durante a estocagem refrigerada .....                                                                             | 148 |
| <b>Figura 13</b> - População de Lac-1 em bebidas lácteas controle e adicionadas de <i>C. albidus</i> e <i>C. laurentii</i> , durante a estocagem refrigerada .....                                                     | 148 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

#### **Relação entre implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a evolução da microbiota na fabricação de bebidas lácteas fermentadas**

**Tabela 1** - Identificação das amostras coletadas em diferentes etapas de fabricação de bebidas lácteas fermentadas ..... 55

**Tabela 2** - Distribuição dos itens em conformidade nos laticínios A e B ..... 59

**Tabela 3** - Características físico-químicas\* das amostras de bebidas lácteas do Laticínio B, durante a estocagem ..... 71

### CAPÍTULO III

#### **Evolução de fungos leveduriformes isolados durante o processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas**

**Tabela 1** - Identificação das amostras coletadas em diferentes etapas de fabricação de bebidas lácteas fermentadas ..... 90

**Tabela 2** - Codificação dos fungos leveduriformes isolados de amostras coletadas no laticínio A ..... 95

**Tabela 3** - Codificação de fungos leveduriformes isolados de amostras coletadas no laticínio B ..... 96

**Tabela 4** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras do laticínio A ..... 97

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados de amostras do laticínio B ..... 98

**Tabela 6** - Distribuição dos fungos leveduriformes isolados das amostras do laticínio B ..... 109

### CAPÍTULO IV

#### **Comportamento *in vitro* e *in situ* de culturas probióticas sobre microrganismos leveduriformes**

**Tabela 1** - Tratamentos *in vitro* para avaliação da capacidade antimicrobiana ..... 125

**Tabela 2** - Atividade antimicrobiana de bactérias probióticas sobre fungos leveduriformes. Valores dos halos de inibição em mm ..... 132

**Tabela 3** - Características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Bb-12 ..... 139

**Tabela 4** - Características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas pela cultura La-5 ..... 140

**Tabela 5** - Características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Lc-1 ..... 140

## LISTA DE QUADROS

### **CAPÍTULO II**

#### **Relação entre implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a evolução da microbiota na fabricação de bebidas lácteas fermentadas**

Anexo A

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Lista de verificação para diagnóstico dos estabelecimentos produtores de bebidas lácteas ..... | 76 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## RESUMO GERAL

Apesar da simplicidade do processo de fabricação, das inovações tecnológicas e da existência de programas de garantia da qualidade, o processo de fabricação das bebidas lácteas pode estar sujeito a inúmeras fontes de contaminação, quando não atendidas às condições básicas de higiene, resultando em alterações indesejáveis no produto. Neste estudo, os objetivos foram: (1) Avaliar a adequação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) em dois laticínios (A e B) produtores de bebidas lácteas fermentadas, por meio de uma lista de verificação baseada na Resolução RDC nº. 275 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e relacionar com a qualidade do produto acabado; (2) Caracterizar a evolução da microbiota em amostras coletadas nos laticínios, durante as etapas do processamento de bebidas lácteas fermentadas, assim como do produto acabado em diferentes tempos de estocagem, por meio da contagem total das bactérias acidoláticas e da enumeração de fungos leveduriformes; (3) Conhecer a microbiota potencial contaminante, por meio da identificação dos fungos leveduriformes isolados de todas as amostras; (4) Verificar o comportamento antimicrobiano *in vitro* das culturas probióticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Lactobacillus casei* (Lc-1) sobre os micro-organismos leveduriformes, *Candida edax*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii*, previamente isoladas de bebidas lácteas comerciais; (5) Avaliar o comportamento *in situ* e *in vitro* de cultura probiótica sobre micro-organismos leveduriformes sensíveis e, estudar o comportamento de pós-acidificação e a viabilidade da microbiota durante a estocagem a 5°C em bebidas lácteas fermentadas. Foram encontrados elevados índices populacionais de fungos leveduriformes, em todas as amostras coletadas no laticínio B. A bebida láctea fermentada produzida pelo laticínio A, foi considerada um produto de excelente qualidade microbiológica e apto para o consumo, até os 60 dias de estocagem, como preconiza a legislação. Das amostras coletadas do laticínio A, foram isolados *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Rhodotorula glutinis*. Durante o processo de fabricação, a partir da etapa de adição da cultura láctica, esses micro-organismos não mais foram encontrados. As amostras do laticínio B

apresentaram contaminantes até os 60 dias de estocagem. As espécies identificadas foram: *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Geotrichum candidum*. Nos ensaios *in vitro*, o sobrenadante livre de células (SLC) e o sobrenadante livre de células concentrado (SLCC) dos cultivos de Bb-12, La-5 e Lc-1 apresentaram antagonismo sobre *C. albidus* e, o SLC e SLCC de Bb-12 e Lc-1 sobre *C. laurentii*. Apesar do antagonismo apresentado pelos probióticos, foi constatada a interação positiva com todas as culturas de *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii*. Nos ensaios *in situ*, a presença dos fungos leveduriformes influenciou os valores de pH e de acidez durante a estocagem refrigerada, além de interferir no tempo de fermentação. Em todas as bebidas lácteas produzidas foi constatada ausência dos leveduriformes até os 60 dias de estocagem. As culturas probióticas comerciais Bb-12, La-5 e Lc-1 demonstraram potencial para serem utilizadas como bioconservantes em produtos lácteos, oferecendo produtos seguros com longa vida de prateleira.

**Palavras-chave:** Produtos lácteos, Probióticos, Boas Práticas de Fabricação (BPF), Fungos leveduriformes, *Candida* sp., *Geotrichum* sp., Antagonismo.

## ABSTRACT

Despite the simplicity of the manufacturing process, technological innovations and the availability of quality assurance programs, the manufacturing process of dairy beverages may be subject to numerous sources of contamination when basic hygiene conditions are not met, resulting in undesirable changes in the product. The aims of this study were: (1) To evaluate the adequacy of Good Manufacturing Practices (GMP) in two dairy (A and B) industries of fermented dairy beverages, against a checklist based on resolution RDC 275 of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and to relate it to the quality of the final product; (2) To characterize the evolution of the micro biota of dairy samples collected during the processing steps of fermented dairy beverages, as well as the final product at different times of storage, by counting the total lactic acid bacteria and the enumeration of yeast; (3) To know the potential contaminant microorganisms, through the identification of yeasts isolated from all samples; (4) To check the *in vitro* antimicrobial behavior of probiotic cultures of *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5) and *Lactobacillus casei* (Lc-1) against *Candida edax*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* and *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii* yeast strains, previously isolated from commercial dairy beverages; (5) To evaluate the *in vitro* and *in situ* antimicrobial behavior of probiotic cultures against sensitive yeast and, to study the post-acidification behavior and viability of microorganisms during storage at 5°C in fermented dairy beverages. A high population of yeasts was found in all samples collected from dairy B. The fermented dairy beverages produced by dairy A were considered to be a product of excellent microbiological quality and suitable for consumption up to 60 days of storage. *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii* and *Rhodotorula glutinis* were isolated from the samples from dairy A. During the manufacturing process, these microorganisms were no longer found after the addition of the starter culture. The dairy B samples showed contamination up to 60 days of storage. The identified species were *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *Candida tropicalis* and *Geotrichum candidum*. During the *in vitro* tests, the cell-free supernatant (CFS) and concentrated cell free supernatant (CCFS) of Bb-12, La-5 and Lc-1 culture

strains showed antagonistic activity against *C. albidus*, and CFS and CCFS of Bb-12 and Lc-1 against *C. laurentii*. Despite the antagonism displayed by the probiotic a positive interaction with all strains of *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* was found. For the *in situ* tests, the presence of yeasts influenced the pH value and the acidity during refrigerated storage and affected the fermentation time. In all dairy beverages produced an absence of yeast up to 60 days of storage was observed. The commercial probiotic strains of Bb-12, La-5 and Lc-1 presented potential for use as a bio-preservative in dairy products, offering safe products with an extended shelf life.

**Keywords:** Dairy products, Probiotics, Good Manufacturing Practices (GMP), Yeasts, *Candida* sp., *Geotrichum* sp., Antagonism.

## INTRODUÇÃO GERAL

Motivadas pelas exigências dos consumidores por produtos saudáveis e saborosos, as indústrias lácteas se empenham para desenvolver produtos que atendam a essas necessidades. Tal perspectiva abriu caminho para o progresso do mercado de produtos lácteos.

As bebidas lácteas fermentadas atendem a tais expectativas. Tratam-se de produtos que, além de oferecerem benefícios à saúde, apresentam baixa viscosidade, propiciando maior praticidade para o seu consumo. A adição de soro de leite ao produto é uma das alternativas para a sua utilização racional, além de reduzir o custo do produto para o fabricante e conseqüentemente para o consumidor.

Apesar da simplicidade do processo de fabricação, das inovações tecnológicas e da existência de programas de qualidade, o processo de fabricação das bebidas lácteas pode estar sujeito a inúmeras fontes de contaminação, principalmente de origem microbiana, quando não atendidas as condições básicas de higiene, resultando em alterações depreciativas no produto.

Apesar da ausência de um padrão oficial para a análise de fungos, sua presença em bebidas lácteas é considerada indesejável, por promover deterioração, por meio de excessiva fermentação, seguida de formação de gás, resultando no comprometimento da vida útil do produto. Diversas espécies desses micro-organismos são capazes de promover toxinfecções alimentares, evidenciando a necessidade de maior aperfeiçoamento dos cuidados na obtenção da matéria-prima, no processo de fabricação, tanto quanto, uma inspeção mais eficaz dos produtos disponíveis no comércio.

Para a fermentação da bebida láctea utiliza-se uma cultura láctica acidificante, responsável pela conversão da lactose em ácido láctico, além de proporcionar as características sensoriais desejáveis ao produto.

As bactérias acidoláticas (BAL) probióticas, em produtos lácteos fermentados, além de promoverem a saúde dos indivíduos, são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos inibindo, se presentes, alguns micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

A adequação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) aliada à adição de determinadas bactérias probióticas, capazes de produzir substâncias antimicrobianas com ação antagonista sobre micro-organismos indesejáveis, representa uma alternativa para oferecer ao consumidor um produto benéfico à saúde, seguro para o consumo e com vida útil estendida.

Neste contexto, os objetivos deste estudo incluem: (1) Avaliar a adequação das BPF em dois laticínios (A e B) produtores de bebidas lácteas fermentadas, por meio de uma lista de verificação (*check-list*) baseada na Resolução RDC nº. 275 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e relacionar com a qualidade do produto acabado; (2) Caracterizar a evolução da microbiota das amostras coletadas nos laticínios durante as etapas do processamento de bebidas lácteas fermentadas, assim como do produto acabado em diferentes tempos de estocagem, por meio da contagem total das bactérias acidoláticas (BAL) e da enumeração de fungos leveduriformes; (3) Conhecer a microbiota potencial contaminante, por meio da identificação dos fungos leveduriformes isolados de todas as amostras; (4) Verificar o comportamento antimicrobiano *in vitro* das culturas probióticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Lactobacillus casei* (Lc-1) sobre os micro-organismos leveduriformes *Candida edax*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii*; (5) Avaliar o comportamento *in situ* e *in vitro* de cultura probiótica sobre micro-organismos leveduriformes sensíveis e, estudar o comportamento de pós-acidificação e a viabilidade da microbiota durante a estocagem a 5°C em bebidas lácteas fermentadas.

A relevância desta pesquisa reside em diagnosticar a relação entre a aplicação adequada e efetiva das BPF com a qualidade do produto obtido, assim como demonstrar que a utilização de culturas probióticas protetoras, além de agregar propriedades funcionais ao fermentado, auxiliam na redução da incidência de contaminação microbiana em bebidas lácteas fermentadas.

Estudos sobre a conservação de alimentos por BAL probióticas demonstram a viabilidade de aplicação em produtos lácteos, contribuindo para o desenvolvimento tecnológico da indústria nacional, com a geração de alimentos seguros e saudáveis, além de contribuir para o aumento de vida útil do produto.

# **CAPÍTULO I**

## **Revisão bibliográfica**

## **1 - Qualidade nas indústrias alimentícias**

O controle da qualidade de alimentos vem sendo objeto de uma constante evolução, visando produzir e oferecer ao consumidor, produtos em acordo com as normas específicas de segurança sanitária (FREO; REOLON, 2006; GERMANO; GERMANO, 2011).

A segurança e a qualidade são duas dimensões inseparáveis em todas as fases da cadeia alimentícia e, requerem mais do que regulamentações e ações de inspeção governamental. Segurança e qualidade dependem da cultura e do conhecimento de todos, para a prevenção e a prática da melhoria contínua tendo em vista, sempre, o consumidor (TOUMINEN et al., 2003).

A qualidade de um produto pode ser avaliada por meio de um conjunto de características ou parâmetros intrínsecos, ou seja, àqueles inerentes ao produto. A gestão dessa qualidade é entendida como uma abordagem adotada ao conjunto de práticas utilizadas para obter-se, de forma eficaz, a qualidade pretendida para o produto (TOLEDO; BATALHA; AMARAL, 2000; GERMANO; GERMANO, 2011).

Os alimentos de origem animal, especialmente o leite e seus derivados, podem servir como veículos para a transmissão de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (NADA et al., 2012). Por isso, é grande a preocupação com o aumento da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos, sobretudo em relação aos patógenos emergentes veiculados por produtos alimentícios. Na atualidade, os consumidores buscam alimentos que possam, simultaneamente, oferecer-lhes segurança e qualidade (GERMANO; GERMANO, 2011).

A preocupação com a qualidade do leite brasileiro produzido, levou o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a uma discussão nacional, envolvendo os setores científicos e econômicos do setor leiteiro, buscando alternativas para melhorar a qualidade do leite produzido no país. Essa discussão resultou na Portaria n. 166 (BRASIL, 1998), que estabeleceu um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor leiteiro no Brasil. Esse grupo desenvolveu uma versão do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), projeto que já vinha sendo desenvolvido desde

1996, e o submeteu à consulta pública pela Portaria n. 56 (BRASIL, 1999). A versão definitiva das novas normas de produção leiteira foi publicada na Instrução Normativa n. 51 (IN51), de 18 de setembro de 2002, que determina novas normas na produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002), que entraram em vigor em 2005. Outro incentivo à modernização da produção leiteira no Brasil ocorreu em 2003, pela Resolução n. 3088 (BRASIL, 2003), que aprovou financiamento de equipamentos de resfriamento e coleta a granel para produtores de leite. A principal razão de todas essas medidas foi a necessidade de adequação das normas publicadas no RIISPOA (BRASIL, 1952) às atuais realidades de produção e consumo de leite no Brasil.

O mercado brasileiro tem demonstrado grande potencial no consumo e na produção de leite, com uma das maiores taxas de crescimento e grande variedade de derivados existentes no mercado (GERMANO; GERMANO, 2011). Historicamente, o Brasil foi um dos principais importadores de produtos lácteos, e em 2005 foi o primeiro ano no qual exportou mais do que importou (KRUG, 2007; VALLIN et al., 2009).

Desde 2007, as indústrias brasileiras têm se desdobrado para aumentar sua competitividade, fundamentalmente por meio de melhoria na qualidade (produtos/processos) e diminuição de custos, passando, se necessário, por processos de reestruturação e reorganização. Os estabelecimentos regularmente avaliados pelos órgãos de inspeção se esforçam para modernizar sua cadeia produtiva, por meio do desenvolvimento e emprego de políticas de segurança alimentar, pela observância da legislação e de tecnologias para a garantia de qualidade e segurança dos alimentos (DAHMER, 2006; CALARGE; SATOLO; SATOLO, 2007).

### **1.1 - Ferramentas para a gestão da qualidade**

Gerenciar a qualidade e a segurança requer a definição de metas e objetivos e, em seguida, planejar e tomar decisões para atingí-los. A indústria deverá integrar-se; pessoas, equipamentos e setores deverão estar

coordenados e sintonizados em objetivos e metas comuns, focando a qualidade como responsabilidade de todos, o que justifica o desenvolvimento e emprego de metodologias, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o Monitoramento Integrado de Pragas (MIP), os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Estes programas visam proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas justas no comércio de alimentos, além de coordenar todas as atividades de padronização de produtos alimentícios acordados pelas organizações internacionais, governamentais e não governamentais (NERO et al., 2005; STAVRIDIS, 2008; GERMANO; GERMANO, 2011).

De acordo com a FAO/WHO (2002), o governo, os produtores, os fabricantes e os manipuladores têm a responsabilidade de assegurar que os alimentos sejam inócuos e aptos para o consumo, destacando-se algumas atribuições:

- Proteger os consumidores das enfermidades transmissíveis por alimentos;
- Garantir que os alimentos sejam adequados para o consumo humano;
- Manter a confiança dos alimentos para o comércio internacional;
- Realizar programas de educação dos princípios de higiene dos alimentos para as indústrias e os consumidores;
- Legislar e fiscalizar.

A indústria deve aplicar as práticas de higiene a fim de produzir alimentos que sejam idôneos para o consumo e manter a confiança nos alimentos comercializados nacionalmente e internacionalmente.

Apesar das inúmeras recomendações e obrigações, em função do número elevado de operações inerentes ao processamento industrial e, da intensidade do manuseio ao longo do processo produtivo até o consumo, os derivados lácteos podem apresentar índices elevados de contaminantes, potencialmente patogênicos ou não. É fundamental que estas operações sejam conduzidas de forma a minimizar ou eliminar os riscos de contaminação em todas as etapas da cadeia produtiva (DAHMER, 2006).

De acordo com Papademas e Bintsis (2010) e Karaman e colaboradores (2012), durante o processamento dos produtos lácteos, os micro-organismos oriundos dos manipuladores, da água, dos equipamentos, dos aditivos e de

outras matérias-primas, podem contaminar os produtos, comprometendo sua vida útil, ou até tornando-os veículos em potencial para a transmissão de doenças. Por isso, as adequações técnicas são fundamentais, pois os micro-organismos estão se tornando mais resistentes aos métodos de conservação convencionais, assim como aos desinfetantes comumente utilizados, representando um perigo para crianças, idosos e pessoas debilitadas clinicamente (DUREK, 2005; RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

A necessidade de um constante aprimoramento das medidas de controle sanitário na produção de alimentos levou o Ministério da Saúde, dentro da sua competência, a elaborar a Portaria n. 1428 de 02/12/1993 (BRASIL, 1993), com orientações necessárias para inspeção sanitária, por meio da verificação do sistema de APPCC, e a Portaria n. 326 de 30/07/1997 que trata das BPF. O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu a Portaria n. 368 de 04/09/1997, que trata das condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos (BRASIL, 1997a; 1997b).

O sistema de APPCC é amplamente recomendado por órgãos de fiscalização e utilizado em toda cadeia produtiva de alimentos. Esse sistema tem como princípios a prevenção, a racionalidade e a especificidade do controle dos riscos que um alimento possa oferecer, principalmente, em relação à qualidade sanitária (BRASIL, 1993).

O *Codex Alimentarius* (2001), baseado nos pré-requisitos do sistema APPCC, estabeleceu as condições necessárias para a higiene e produção de alimentos seguros, atuando no controle de cada etapa do processamento dos alimentos. O sistema APPCC atua como um plano para minimizar os riscos de ocorrência desse evento, por meio do controle dos procedimentos em pontos críticos específicos, durante a produção dos alimentos, ao invés de detectar, por exemplo, a presença de micro-organismos patogênicos no final do processamento (TUOMINEN et al., 2003).

Para a implantação do sistema de APPCC, as BPF são de grande relevância, sendo consideradas pré-requisitos e parte integrante das medidas de segurança alimentar, e ponto referencial para a elaboração de normas reguladoras (legislação) da produção de alimentos (ROPKINS; BECK, 2000; RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

As BPF são compostas por um conjunto de princípios e regras para o correto manuseio de alimentos, que abrange desde a recepção das matérias-primas até o produto acabado, a fim de garantir a integridade dos alimentos e a saúde dos consumidores (NASCIMENTO; BARBOSA, 2007). O âmbito de sua aplicação é obrigatório pela legislação brasileira, para toda pessoa física ou jurídica que possua pelo menos um estabelecimento no qual se realizem algumas das seguintes atividades: elaboração/industrialização, fracionamento, armazenamento e transporte de alimentos destinados ao comércio nacional e internacional. Sua implantação exige a obediência de uma série de etapas que devem ser desenvolvidas e constantemente reavaliadas (LOVATTI, 2004).

De maneira específica, quatro pontos principais das BPF devem ser considerados na produção de alimentos seguros e de qualidade (AKUTSU et al., 2005; TOMICH et al., 2005):

- Termos relevantes - pontos críticos de controle e práticas referentes ao pessoal;
- Instalações - áreas externas, ventilação e iluminação adequadas, controle de pragas, uso e armazenamento de produtos químicos, abastecimento de água e coleta de lixo;
- Requisitos gerais de equipamentos - construção, facilidade de limpeza e manutenção;
- Controles de produção.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu a Resolução n. 275 de 21 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002b), sugerindo os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) a fim de facilitar e padronizar a confecção do manual das BPF. Esse procedimento tem a função de orientar tanto a inspeção sanitária como os manipuladores do estabelecimento produtor. O manual deve conter: apresentação, definição, objetivos, campo de aplicação, denominações, responsabilidade técnica, requisitos legais para o funcionamento, clientela a ser atendida, fluxograma do processo de produção, aspectos administrativos e organizacionais: físicos e ambientais, recursos humanos, educativos e de funcionamento, higiene dos alimentos, dos manipuladores/colaboradores, procedimentos de limpeza e desinfecção, higiene dos equipamentos e utensílios, aspectos financeiros e controle integrado de pragas (LOPES, 2004).

Os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) são representados por requisitos das BPF considerados críticos na cadeia produtiva de alimentos. Para esses procedimentos, recomenda-se a adoção de programas de monitoramento, registros, ações corretivas e aplicação constante de listas de verificação. Tais procedimentos foram adequados à realidade brasileira e denominados Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) (BRASIL, 2002b), que vão um pouco além do controle da higiene, porém, não descaracterizam os PPHO, que continuam sendo recomendados pelo MAPA.

Uma das ferramentas utilizadas para se diagnosticar a gestão da qualidade, seguindo os conceitos dos PPHO e dos POP, é a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos, determinada pela Resolução RDC n. 275 da ANVISA (BRASIL, 2002b). Essa lista de verificação fornece uma avaliação preliminar das condições higiênico-sanitárias nos estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos (NASCIMENTO; BARBOSA, 2007). Os itens avaliados são relativos a edificações e instalações, equipamentos, manipuladores, produção e transporte do alimento e documentação. A partir desta avaliação obtêm-se os itens não conformes e, com os dados coletados, é possível traçar ações corretivas para adequação de instalações, procedimentos e processos produtivos, buscando eliminar ou reduzir riscos físicos, químicos e biológicos, que possam comprometer os alimentos e a saúde do consumidor (LOPES, 2004; GENTA; MAURICIO; MATIOLI, 2005).

Em 2003, a Resolução n. 10 de 22 de maio (BRASIL, 2003) instituiu o programa PPHO para ser utilizado especificamente nos estabelecimentos de leite e derivados, que funcionam sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF), como etapa preliminar de programas de qualidade, como o APPCC.

É de vital importância o conhecimento das características do produto processado pelos manipuladores, assim como na compreensão do processo e de suas particularidades. Outro aspecto relevante é o envolvimento da alta administração. O seu apoio aos treinamentos é fundamental para creditar a importância devida às idéias e conceitos transmitidos (STAVRIDIS, 2008; MADRONA; PIOLA; TERRA, 2009).

A adoção de ferramentas para a gestão da qualidade só será efetiva, a partir de uma aliança entre uma administração engajada e equipes

operacionais capacitadas, por meio de um programa de treinamento e avaliação, onde serão verificadas as características e competências do indivíduo, reciclados seus conhecimentos e principalmente inseridos novos conceitos relacionados ao processo e ao produto nele envolvido. Para uma boa capacitação operacional é essencial que desde o momento da integração, o manipulador entenda o motivo dos controles e dos cuidados em uma planta de processamento (STAVRIDIS, 2008).

### **1.1.2 - Higienização como ferramenta de gestão da qualidade em indústrias laticinistas**

Dentre as ferramentas de gestão da qualidade nas indústrias de laticínios, a gestão da qualidade sanitária se baseia em promover a higienização pessoal, operacional e ambiental.

Após o processamento do leite ou de seus derivados, os equipamentos, utensílios, pisos, paredes e o ambiente de maneira geral, passam a apresentar uma carga elevada de resíduos com alto valor nutritivo, com a presença de carboidratos, gorduras, proteínas e minerais passíveis de multiplicação microbiana (GERMANO; GERMANO, 2011). Com o intuito de impedir possíveis contaminações posteriores, toda área de manipulação, equipamentos e utensílios, devem ser limpos freqüentemente e desinfetados sempre que as circunstâncias assim o exigirem (BRASIL, 1997a; 1997b).

A pré-lavagem, lavagem com detergentes e aplicação de sanificantes é um aspecto importante, pois após o enxágüe normalmente os equipamentos e utensílios ficam à espera de um novo turno para serem utilizados. Se tomados os procedimentos corretamente, estes impedem a aderência de micro-organismos patogênicos às superfícies, ou seja, evitam a formação de biofilmes microbianos. Além disso, quando a sanitização é empregada de forma eficiente, previne contaminações posteriores, diminuindo a possibilidade de perdas de alimentos (FEIJÓ et al., 2002).

Existem alguns pontos importantes que devem ser observados na higiene e sanitização de equipamentos que entram em contato com o alimento, tais como: o tipo de material utilizado para a limpeza, a qualidade e concentração dos produtos químicos utilizados, a temperatura e o tempo de

emprego dos mesmos, a natureza da superfície que sofrerá higienização, o tipo de sujidade, além da educação e treinamento corretos dos funcionários encarregados da limpeza (HOFFMANN, 2001; FEIJÓ et al., 2002; GERMANO; GERMANO, 2011).

Além da eficiência em eliminar os micro-organismos de equipamentos e instalações, o processo de higienização não deve interferir nas propriedades nutricionais e sensoriais do alimento e, deve garantir a preservação da integridade e das características microbiológicas naturais e benéficas do alimento (GERMANO; GERMANO, 2011; HOFFMANN, 2001).

## **2 - Bebidas lácteas fermentadas**

Nos últimos anos, o interesse e a procura por produtos cada vez mais diferenciados têm crescido de forma significativa, não apenas pelas características sensoriais, mas também pelas atribuições à saúde. São inúmeras as variedades presentes no mercado, especialmente dos derivados lácteos, incluindo novos sabores, novas texturas e formas de apresentação, aliados a menores custos (MAGALHÃES et al., 2005; THAMER; PENNA, 2006; NADA et al., 2012).

A produção de bebidas lácteas fermentadas teve início na década de 90 e, são formuladas contendo iogurte, soro de leite (com variação de 30,0 a 70,0 %), polpas de frutas, outras matérias-primas e aditivos permitidos. O produto final deve apresentar os micro-organismos de forma viável e abundante (SEIBEL; CANSIAN, 2000; FERREIRA, 2003; LIMA, 2003; BRASIL, 2005; PAULA, 2010).

Nos últimos anos, a popularidade das bebidas lácteas se deve a diversos fatores: ao maior nível de informações sobre os benefícios nutricionais (importante fonte de cálcio e à qualidade das proteínas); por apresentar baixa viscosidade, sendo consumida como bebida suave e refrescante; ao menor custo do produto para o fabricante e à redução do preço final para o consumidor (VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000; SANTOS; FERREIRA, 2001; FERREIRA, 2003; THAMER; PENNA, 2006; MARCHIORI, 2006; PAULA, 2010; CALDEIRA et al., 2010; PENNA, 2010).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, pautado na Instrução Normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005 (MAPA), as bebidas lácteas fermentadas são produtos resultantes da fermentação, por cultivos específicos e/ou adição de leites fermentados, da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó), adicionado ou não de gordura vegetal ou substâncias alimentícias e, isento de tratamento térmico após a fermentação. A base láctea deve representar pelo menos 51,0 % (massa/massa) do total de ingredientes do produto. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de  $10^6$  Unidades Formadoras de Colônias - UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. As bebidas lácteas podem conter em sua formulação, além do soro do leite e dos cultivos de bactérias lácticas, acidulantes, aromatizantes, espessantes, emulsificantes, corantes, conservantes, pedaços, polpa ou sucos de fruta e mel (BRASIL, 2005).

No Brasil, o uso de soro de leite para a formulação de bebidas lácteas, é uma das mais atrativas opções para as indústrias, sendo a principal responsável pelo alto valor nutritivo atribuído às bebidas lácteas.

O soro de leite contém mais da metade dos nutrientes do leite, os quais são representados por proteínas, vitaminas, minerais, enzimas e lactose. As características nutricionais e funcionais das proteínas do soro estão relacionadas à sua composição, estrutura e função biológica (LUIZ, 2008). O soro de leite é muito indicado para dietas incompletas ou inadequadas em função de sua riqueza nutricional, devido à presença de aminoácidos essenciais que são facilmente digeridos, assim como as vitaminas hidrossolúveis (tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>) e aos minerais (cálcio, magnésio, zinco, potássio e fósforo) (FERREIRA, 2003; PENNA, 2010).

O soro de leite contém vários peptídeos bioativos, produzidos durante o processo de fermentação, que apresentam efeitos terapêuticos positivos em doenças cardiovasculares, tais como: redução dos níveis de colesterol, atividade anti-hipertensiva, antitrombótica e opióide (HAQUE; CHAND, 2008; PENNA; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2009; SZWAJKOWSKA et al., 2011).

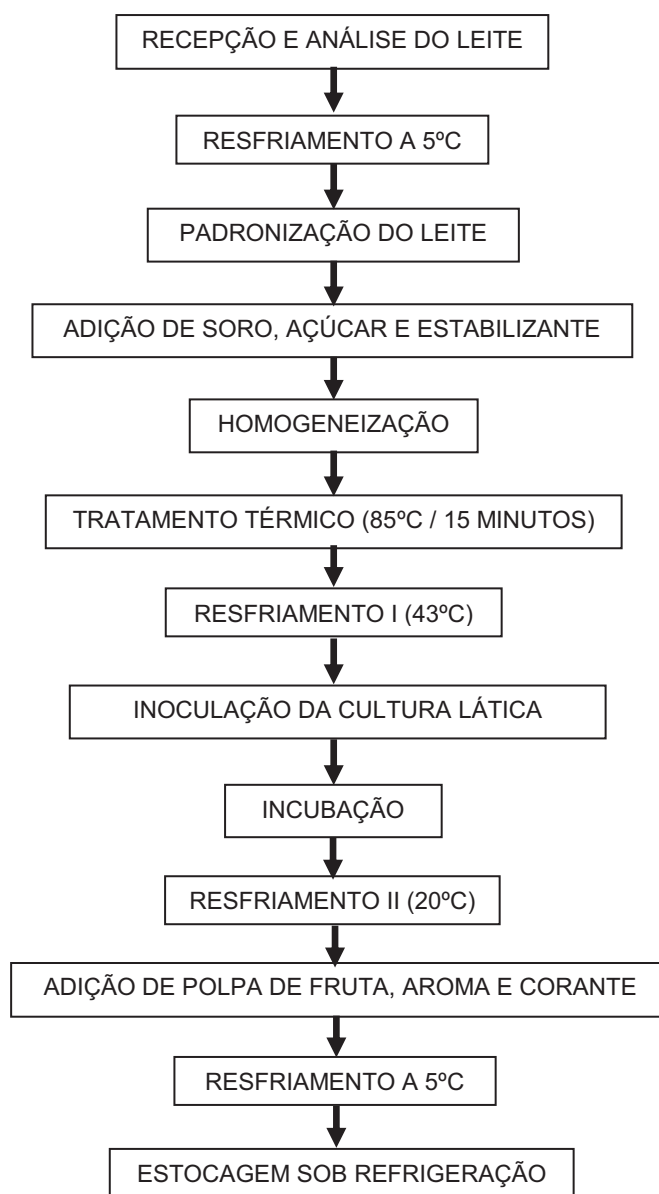
Apesar da importância atribuída ao desenvolvimento das bebidas lácteas, dentre os derivados lácteos, o queijo é sem dúvida o de maior destaque, sua produção em 2001 foi de 468 mil toneladas, saltando para 664 mil em 2009 (USDA, 2009). Sabe-se que a cada quilograma de queijo produzido, resulta em aproximadamente nove litros de soro de leite. Portanto, um incalculável volume de soro é gerado. Entretanto, no Brasil, o soro de leite não é reconhecido como uma matéria-prima com excelentes propriedades nutricionais, visto que grande parte do volume produzido, não é tratado adequadamente, podendo ser desprezado na sua forma *in natura* em efluentes, gerando prejuízos sociais, econômicos e ambientais. Cerca de 50,0 % do soro produzido na fabricação de queijos, não é aproveitado, sendo descartado em rios e mananciais (FONTES, 2007). Uma importante fonte de proteínas e lactose a um baixo custo poderia ser bem aproveitada gerando empregos, aumentando a renda de empresários, proporcionando maior capital de circulação, além de minimizar os custos com tratamento de efluentes e danos ambientais (OLIVEIRA, 2008).

Desta forma, o aumento do consumo das bebidas lácteas intensifica a utilização racional do soro de leite, além de reduzir os problemas relativos ao seu descarte (SANTOS et al., 2008; CALDEIRA et al., 2010).

Além da bebida láctea, são inúmeras as aplicações do soro de leite, tais como: produção de soro em pó, ricota, concentrado protéico, isolado protéico, lactose, ácido láctico, álcool e vinagre (PINTADO et al., 2001; OLIVEIRA, 2006; CALDEIRA et al., 2010).

Neste contexto, a produção de bebidas lácteas fermentadas por micro-organismos probióticos aumenta os valores nutritivo e terapêutico, devido à presença de uma microbiota responsável por uma série de reações benéficas ao consumidor.

Um fluxograma geral do processo de fabricação das bebidas lácteas fermentadas está apresentado na Figura 1, utilizando-se principalmente os equipamentos comuns ao beneficiamento do leite, 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; REIS, 2008).



**Figura 1** - Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas (REIS, 2008).

O leite, usado como base das bebidas lácteas, deve ser: de boa qualidade, higienicamente produzido e manipulado, conservado ao abrigo da luz, de composição normal e isento de antibióticos e conservantes (RASIC; KURMANN, 1978). Quanto ao soro de leite, sua composição pode variar substancialmente dependendo do tipo de queijo produzido ou do método de extração da caseína empregado (PEREIRA, 2002; REIS, 2008).

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 micro-organismos patogênicos, de resíduos de antibióticos e sanitizantes, sabor e odor normais e extrato seco elevado (TAMIME; ROBINSON, 2007; REIS, 2008).

A padronização do leite (sólidos totais e gordura) tem como funções melhorar a consistência e minimizar a sinérese no produto final. A consistência é um atributo importante na aceitação do produto pelo consumidor. Segundo Tamime e Robinson (2007), quanto maior o extrato seco do leite utilizado para a fabricação do iogurte, maiores serão estes atributos tecnológicos. Para a fabricação de bebidas lácteas, esse parâmetro tem menor importância, por se tratar de uma bebida líquida. O teor de gordura afeta igualmente a qualidade tecnológica dos lácteos fermentados. A gordura estabiliza a contração do gel protéico, prevenindo a separação do soro no produto final, resultando no aumento da viscosidade do leite e, conseqüentemente, na estabilidade do produto durante a estocagem (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A principal finalidade da adição de açúcares ou agentes edulcorantes é atenuar a acidez do produto (TAMIME; ROBINSON, 2007). O açúcar normalmente é adicionado na forma sólida antes da pasteurização e, deve preferencialmente ser refinado para evitar a incorporação de impurezas. Sua concentração pode variar até 12,0 %, pois acima deste valor pode haver um aumento da pressão osmótica, suficiente para inibir o desenvolvimento normal das bactérias da cultura (BRANDÃO, 1997; REIS, 2008).

Os estabilizantes são empregados com o intuito de reduzir ou eliminar o risco de sinérese, aumentar a viscosidade e melhorar a cremosidade do produto final (NICOLAU; OLSEN, 2002).

A homogeneização visa a redução do tamanho dos glóbulos de gordura, impedindo a formação de uma camada lipídica sobre a superfície do leite durante a fermentação, permitindo maior integração da gordura com as micelas de caseína durante a coagulação, resultando no aumento da viscosidade do leite e, conseqüentemente, estabilidade do fermentado durante a estocagem (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Essa operação também promove a dispersão homogênea dos constituintes, principalmente a gordura, melhorando sabor, consistência, apresentação e digestibilidade do produto (RASIC; KURMANN, 1978). 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, 2001; REIS, 2008).

O tratamento térmico do leite ou da mistura tem como objetivos principais: destruir os micro-organismos patogênicos e melhorar a consistência e a viscosidade do produto, por meio da desnaturação das proteínas do soro, que reduzem a contração do coágulo da caseína, diminuindo, conseqüentemente a sinérese (RASIC; KURMANN, 1978; TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001; REIS, 2008).

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; REIS, 2008).

O tratamento térmico pode estimular o início do desenvolvimento das bactérias da cultura láctica por redução do conteúdo de oxigênio do leite e, dependendo das condições aplicadas, pode favorecer ou inibir o desenvolvimento posterior (VARNAN; SUTHERLAND, 2001; REIS, 2008).

Após o tratamento térmico, a mistura é resfriada na faixa de 40-45°C para a inoculação da cultura láctica (TAMIME; ROBINSON, 2007). Essa faixa de temperatura corresponde à média daquelas ótimas dos micro-organismos: *Streptococcus thermophilus* (39°C); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (45°C); *Lactobacillus acidophilus* (38°C) e *Bifidobacterium* spp. (39°C), e favorece o desempenho desses micro-organismos por meio de uma interação estabelecida entre eles (GOMES; MALCATA, 1999).

A fermentação pode ser entendida como o processo metabólico no qual ocorrem mudanças químicas nos componentes orgânicos do leite: proteínas, carboidratos e gorduras, por meio da ação de enzimas secretadas pelas

bactérias lácticas (BRANDÃO, 1997). Nesse processo, basicamente, ocorrem os seguintes fenômenos:

- Transformação da lactose em ácido láctico, conferindo o sabor ácido, abaixando o pH para aproximadamente 4,6, o qual corresponde ao ponto isoelétrico da caseína, provocando a coagulação do leite;
- Produção de diversos compostos voláteis, sendo o acetaldeído o principal deles;
- Formação de outros compostos, tais como exopolissacarídeos, que aumentam a viscosidade, além de ácido fólico e bacteriocinas (TAMIME; ROBINSON, 2007).

Kurmann (1977) recomendou inoculações mínimas para impedir uma acidificação intensa, como por exemplo, 0,5 a 1,0 % de cultura (teor utilizado atualmente), pois afirmava ser a percentagem de semeadura dependente de vários fatores, tais como: o poder acidificante das culturas; o tempo de incubação desejado; a riqueza em células bacterianas e a fase de desenvolvimento na qual a cultura se encontra.

Como a elaboração das bebidas lácteas fermentadas consiste em um processo biológico, é necessário o monitoramento da temperatura para otimizar a atividade metabólica dos micro-organismos. Após o processo fermentativo, o objetivo de um resfriamento é reduzir a temperatura do coágulo de 30-45°C para 10°C (para cessar a atividade microbiana), tão rapidamente quanto seja possível, para controlar a acidez final (TAMIME; ROBINSON, 2007). Em seguida procede-se a adição de polpa de frutas, aromas e corantes conferindo as características desejáveis ao produto final (VARNAN; SUTHERLAND, 2001; BRANDÃO, 1997). Por fim, as bebidas são resfriadas a 5°C, envasadas e estocadas sob refrigeração.

A escolha do material, para o envase do produto acabado, é de suma importância, pois falhas cometidas na escolha da embalagem podem trazer repercussões graves à qualidade do produto embalado, em termos econômicos e de saúde pública (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, 2007).

As bebidas lácteas fermentadas deverão ser conservadas e comercializadas em temperatura não superior a 10°C. O seu armazenamento nessas condições ocasiona uma diminuição das reações bioquímicas e biológicas resultantes da atividade metabólica das culturas lácticas e de possíveis contaminantes (TAMIME; ROBINSON, 2007). O transporte da indústria para o comércio deve ser o mais rápido possível e em caminhões refrigerados, para evitar a depreciação da qualidade do produto (RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

### **3 - Alimentos Probióticos**

O avanço tecnológico no setor alimentício, bem como o acesso a novos conhecimentos científicos, tem promovido mudanças nos conceitos de nutrição. Os alimentos, antes consumidos apenas para atender as necessidades básicas de sobrevivência, passaram a ser consumidos em virtude da qualidade, bem-estar físico e mental (GALVÃO, 2002; PASSOS; PARK, 2003; BRANDÃO, 2007).

A expressão "alimentos funcionais" foi introduzida pela primeira vez na década de 80, pelo governo do Japão, com o objetivo de desenvolver alimentos que reduzissem os gastos com a saúde, levando em consideração a elevada expectativa de vida no país. O Japão foi pioneiro na formulação do processo de regulamentação específica para os alimentos funcionais (STRINGHETA et al., 2007).

Atualmente, são considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde e/ou que possuem potencial para promover a saúde, por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional. Esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (GRANATO et al., 2010; REIS et al., 2011).

O caráter funcional pode ser atribuído a uma qualidade inerente à matéria-prima ou a uma característica implementada, por meio de tecnologias de processamento inovadoras ou a adição de ingredientes promotores da saúde, tal como a adição de probióticos na matriz alimentar (BISTROM; NORDSTROM,

2002). As indústrias, simultaneamente, estão se esforçando para oferecer ao mercado consumidor produtos com essas inovações.

A palavra probiótico foi citada pela primeira vez por Lilley e Stillwell em 1965, ao se referirem a uma substância secretada por um micro-organismo que estimulava o desenvolvimento de outro. Mais tarde, em 1989, Fuller modificou o conceito para suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro animal por melhorar seu balanço microbiano intestinal (FULLER, 1995; FAO/WHO, 2002).

O termo probiótico, derivado do grego, significa “para a vida” (SHAH, 2007). No Brasil, o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticas Isolados com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Resolução RDC n. 2 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002a), os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, ingeridos em certa quantidade, são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. A possibilidade de que o consumo de micro-organismos vivos nos produtos lácteos fermentados pudesse manter o equilíbrio entre bactérias patogênicas e não patogênicas fez com que as bactérias acidoláticas passassem a ser estudadas em relação a seus possíveis efeitos probióticos (OLIVEIRA, 2008).

Os mecanismos de ação dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana incluem fatores como os efeitos antagônicos, de competição e imunológicos, resultando, para o hospedeiro, em um aumento da resistência contra patógenos. A utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de micro-organismos potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (SAAD, 2006; SHAH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

São muitos os benefícios à saúde, atribuídos a ingestão de alimentos probióticos, tais como: redução de infecção por *Helicobacter pylori*, muito associado a gastrites e úlceras pépticas (CRUCHET et al., 2003), propriedades antimicrobianas, prevenção e tratamento de diarreias, eliminação dos sintomas da intolerância à lactose, propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas, estímulo ao sistema imunológico, resistência à infecções do trato urogenital, regularização da função intestinal, combatendo a constipação intestinal e redução do colesterol sérico (BOMBA et al., 2002; SAAD, 2006; NAGPAL,

2007; SHAH, 2007). Os probióticos também são recomendados para tratamento dos sintomas de dermatites, gastrites, úlceras gástricas, doenças alérgicas e de origem alimentar e no tratamento da síndrome do intestino irritável (SANTOSA; FARNWORTH; JONES, 2006; BOYLE; TANG, 2006; CANDY et al., 2008; RODGERS, 2008; VASILJEVIC; SHAH, 2008; GUPTA; GARG, 2009; REIS et al., 2011).

Para que as bactérias probióticas promovam benefícios aos seus consumidores, esses micro-organismos devem ser viáveis e principalmente, disponíveis em altas concentrações ( $10^6$  -  $10^7$  UFC/g), durante toda a vida de prateleira do produto, além de serem capazes de transitar pelo trato gastrointestinal. Atualmente, a recomendação de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos é baseada na porção diária do produto pronto para consumo, sendo o mínimo estipulado de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g (BRASIL, 2008; REIS et al., 2011). É também necessário que sejam capazes de aderir às células do epitélio intestinal, colonizar o lúmen do trato, produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos e estabilizar a microbiota intestinal (PARVEZ et al., 2006, SHAH, 2007).

A Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (BRASIL, 2008) estabelece que a documentação referente à comprovação de eficácia deve incluir: laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade, teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares, e a quantidade do probiótico em UFC, contida na porção diária do produto pronto para consumo, que deve ser declarada no rótulo, próxima à alegação.

Os veículos existentes para carrear as bactérias probióticas integram três grandes grupos: alimentos infantis, preparações farmacêuticas e produtos lácteos. Destes, o mais representativo é o dos produtos lácteos, tais como os iogurtes, os demais leites fermentados e as bebidas lácteas (GOMES; MALCATA, 1999; REIS, 2008).

Para o micro-organismo ser utilizado como probiótico é necessário o atendimento de alguns critérios, tais como: ser de origem humana (biossegurança); resistente ao suco gástrico e à bile; atóxico e não patogênico; possuir identificação taxonômica precisa; capaz de exercer pelo menos um

efeito clínico benéfico à saúde documentado; geneticamente estável; promover características sensoriais adequadas ao produto; estável e viável durante o armazenamento. As culturas podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, promovendo as características sensoriais desejáveis (OLIVEIRA et al., 2002; MERCENIER; PAVAN; POT, 2003; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As culturas probióticas, por apresentarem baixa atividade proteolítica, crescem mais vagarosamente em lácteos, fazendo-se necessário o suplemento exógeno de peptídeos e aminoácidos para seu desenvolvimento ótimo (SHIHATA; SHAH, 2002). Portanto, com o objetivo de acelerar o processo de fermentação, sugere-se a adição de culturas tradicionalmente utilizadas na fabricação de iogurtes àquelas probióticas na fabricação dos produtos lácteos.

Sendo assim, os experimentos envolvendo os probióticos exigem uma atenção especial aos seguintes aspectos: tipo do micro-organismo probiótico, método de produção e de administração, viabilidade da preparação, condições do hospedeiro e da microbiota intestinal.

### **3.1 - Bactérias probióticas**

As bactérias acidoláticas (BAL) são Gram-positivas, bacilares ou cocóides, não esporulantes e catalase-negativas. Formam um grupo bastante heterogêneo quando se refere à capacidade de assimilar oxigênio, podendo ser anaeróbias, anaeróbias facultativas, aeróbias e microaerófilas. São micro-organismos que apresentam alta tolerância ao ácido, estritamente fermentadores, produzindo ácido lático como o principal produto metabólico (BROADBENT; STEELE, 2005). São amplamente difundidos nos alimentos, especialmente em produtos cárneos e lácteos (BROMBERG et al., 2006).

Basicamente as BAL apresentam três funções: acidificação, textura e realce de sabor e odor. Esses micro-organismos possuem enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, que transformam os nutrientes presentes no leite, promovendo sua fermentação por meio do acúmulo de ácidos orgânicos e conseqüente acidificação do meio (redução do valor de pH para 4,6 a 4,0), alterando as características finais do produto e impedindo o desenvolvimento

da maioria dos micro-organismos indesejáveis (VILJOEN et al., 2001; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

O emprego das BAL probióticas no processo de fabricação de produtos fermentados tem melhorado a qualidade do produto final. Isso permite que o tempo de conservação dos produtos fermentados seja muito maior que a dos produtos no qual a matéria-prima não foi fermentada (FORSYTHE, 2002).

A literatura relata um número considerável de espécies probióticas: *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*), *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis*) e bactérias Gram-positivas. Outros micro-organismos, dos gêneros *Bifidobacterium* (*B. infantis*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum*, *B. thermophilum*) *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. mundii*) e *Saccharomyces* spp., são encontrados em produtos probióticos de mercado (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005, SHAH, 2007; PARADA et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; EL-GHAISH et al., 2011).

Estudos mais recentes têm demonstrado clara e inequivocamente a relevância para a saúde de dois micro-organismos probióticos: *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus*. Estas bactérias têm ações que se potencializam mutuamente, isto é, têm entre si uma relação de simbiose (FERREIRA, 2003; KEMPKA et al., 2008; DERAZ et al., 2007; CHEIKHYOUSSEF et al., 2010).

De acordo com as especificidades de cada espécie e das condições de desenvolvimento, as BAL são capazes de produzir uma série de substâncias de caráter antimicrobiano. As mais conhecidas são os ácidos láctico e o acético, correspondendo a mais de 90,0 % da produção de ácidos orgânicos, além do propiônico e de outros metabólitos, como peróxido de hidrogênio, diacetil, acetaldeído, dióxido de carbono e bacteriocinas, de forma a impedir o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos indesejáveis (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; SHAH, 2007; DE VUYST; LEROY, 2007).

Tais substâncias antimicrobianas auxiliam na manutenção da qualidade do produto lácteo, suprimindo o desenvolvimento tanto de micro-organismos deteriorantes, quanto dos potencialmente patogênicos (VAUGHAN et al., 1994; JAMUNA; JEEVARATNAM, 2004), propiciando ao produto, melhores propriedades físico-químicas, sensoriais e microbiológicas (KOS et al., 2008),

além de benefícios para saúde de seus consumidores (DE VUYST; LEROY, 2007).

Nos últimos anos, algumas BAL probióticas e seus metabólitos antimicrobianos, também chamados de bioconservantes, têm sido estudados e aplicados em produtos lácteos (SHAH, 2007; DE VUYST; LEROY, 2007). A ação antimicrobiana ou antagonista atribuída a algumas espécies de BAL, sobre micro-organismos indesejáveis em alimentos, tem sido descrita em vários estudos, tendo como focos principais: a conservação de alimentos e o controle de patógenos.

Pesquisas constataram que algumas espécies dentre os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* apresentaram um amplo espectro de ação sobre micro-organismos patogênicos, como *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e deteriorantes, como as bactérias do grupo coliforme (SAVADOGO, 2006; ABO-AMER, 2007; DERAZ et al., 2007; SHAH, 2007, DE VUYST; LEROY, 2007; CHEIKHYOUSSEF et al., 2009; IZQUIERDO et al., 2009; CHEIKHYOUSSEF et al., 2010; EL-GHAISH et al., 2011).

Estudos realizados com *Lactococcus lactis* evidenciaram a produção de uma bacteriocina denominada nisina, capaz de inibir o desenvolvimento de uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas, como a *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* spp. É importante ressaltar que a eficiência inibitória da nisina depende dos níveis de contaminação do alimento. Caso a contaminação inicial seja muito elevada, a atividade da nisina é restrita, não impedindo a deterioração do produto (MORENO; LERAYER; LEITÃO, 2008).

Outros estudos relataram o comportamento antagonista da cultura *L. acidophilus* sobre *E. coli* e *S. aureus*, provavelmente devido à presença do ácido láctico e conseqüente redução do valor de pH, além da capacidade de síntese de várias bacteriocinas, tais como lactocidina, acidolina, acidofilina, lactacium-B e proteínas inibidoras (SHAH, 2007; PEREIRA, GÓMEZ, 2007).

Apesar da existência de diversos estudos sobre o comportamento antagonista entre BAL probióticas e patógenos, pouco se conhece dessa ação sobre micro-organismos deteriorantes, principalmente sobre fungos leveduriformes, um dos grandes responsáveis pelo comprometimento da

qualidade dos produtos lácteos fermentados. Sob o ponto de vista econômico, a identificação de BAL probióticas capazes de produzir compostos antimicrobianos, pode resultar em potencial aplicação na conservação dos alimentos.

### 3.1.1 - Gênero *Bifidobacterium*

De acordo com Vasiljevic e Shah (2008), as bifidobactérias foram isoladas e identificadas pela primeira vez por Tissier em 1900, a partir de fezes de recém-nascidos amamentados somente com leite materno. A colonização da microbiota intestinal começa imediatamente após o nascimento e o seu desenvolvimento é fortemente dependente de fatores ambientais. A microbiota de recém-nascidos apresenta baixa diversidade e é instável; porém, evolui para uma microbiota mais estável e adulta após os 24 primeiros meses de vida. Por outro lado, uma microbiota mais diversificada, composta por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* e *Staphylococcus*, é encontrada em recém-nascidos alimentados com fórmulas infantis, em crianças e em adultos (LAPARRA; SANZ, 2010; REIS et al., 2011).

O gênero *Bifidobacterium* compõe espécies anaeróbias estritas, imóveis, Gram-positivas, não esporulantes, em forma de bastonete curvo, caracterizado freqüentemente por uma bifurcação em forma de "Y" (HOLT, 1994). As características morfológicas das colônias do *B. animalis* podem variar em tamanho e forma conforme o meio de cultivo empregado (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

As bifidobactérias são habitantes naturais do trato intestinal e podem inibir a colonização e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Tal comportamento antagonista se deve a síntese dos ácidos acético e láctico, e pequena quantidade de ácido fórmico, propiônico e butírico. Esses compostos são capazes de diminuir o pH do cólon, inibindo o desenvolvimento dos indesejáveis (BARBOSA et al., 2001; SHAH, 2007).

A administração de substâncias químicas antimicrobianas (antibióticos) pode causar supressão de certos grupos de bactérias benéficas, incluindo as bifidobactérias, que promovem resistência natural do hospedeiro contra infecções. A susceptibilidade das bifidobactérias aos antibióticos deve ser

conhecida não somente na pesquisa de agentes seletivos para enumeração de células viáveis em produtos contendo bifidobactérias, mas também na compreensão da alteração da microbiota intestinal normal quando os antibióticos são ministrados (BARBOSA et al., 2001).

Em consequência de seu metabolismo fermentativo, o gênero *Bifidobacterium* é considerado um dos principais responsáveis pela inibição de alguns patógenos como, *H. pylori* e *Salmonella enterica* Typhimurium. Alguns estudos relatam que *B. bifidum* NCFB 1454 é capaz de sintetizar bacteriocinas ou peptídios antimicrobianos de amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes. Dentre essas bactérias se incluem: *C. difficile*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* Typhimurium, *H. pylori* e *Campylobacter coli* (COLLADO; HERNÁNDEZ; SANZ, 2005; SANZ; COLLADO; DALMAU, 2006).

### 3.1.2 - Gênero *Lactobacillus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* apresentam importante valor comercial para a indústria alimentícia, em virtude do seu emprego na produção de lácteos fermentados, como culturas iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos e do seu apelo funcional (VÁSQUEZ et al., 2005; REIS et al., 2011).

O gênero *Lactobacillus* é o mais amplo e, diversas espécies deste gênero são produtoras de substâncias antimicrobianas. É um grupo heterogêneo de micro-organismos, sendo constituído por várias espécies e algumas sub-espécies. Estes micro-organismos são Gram-positivos, incapazes de formar esporos, imóveis, geralmente são encontrados em pares ou cadeias, variando de cocobacilos a bacilos, sendo microaeróbios com desenvolvimento ótimo em anaerobiose. Esse gênero pode ser subdividido em dois grupos, baseados no metabolismo de carboidratos: homofermentativos (produzem predominantemente ácido lático) e heterofermentativos (produzindo dióxido de carbono, etanol, e/ou ácido acético e ácido lático). Os lactobacilos possuem temperatura ótima de desenvolvimento entre 30 e 40°C, classificando-se como micro-organismos mesófilos, e são acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 - 6,2 (ZAMFIR et al., 2000; ROBINSON, 2002; PAULA, 2010).

A literatura relata alguns estudos que verificaram a atividade antimicrobiana de algumas espécies probióticas do gênero *Lactobacillus* sobre patógenos. Calderón e colaboradores (2007) observaram redução da população de *S. aureus* e de *L. monocytogenes*, em níveis não detectáveis, após 12 dias de armazenamento de iogurtes contendo *L. casei* CRL 431 e *L. acidophilus* CRL 730 em co-cultura, adicionados ou não de *L. rhamnosus* LR 35. No mesmo estudo, houve redução da população de *E. coli* O157:H7, em níveis não detectáveis, aos 8 dias de armazenamento daqueles produtos. Nos iogurtes isentos de probióticos, a ausência completa de patógenos somente foi observada após 20 dias de armazenamento.

### 3.1.2.1 - *Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus acidophilus* foi isolado pela primeira vez por Tiesser e Moro, a partir de fezes de lactentes, o qual recebeu o nome de *Bacillus acidophilus*. Posteriormente, foi denominado *Lactobacillus acidophilus*, e anos depois, verificou-se que este micro-organismo possui a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal proporcionando benefícios aos seus consumidores (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Trata-se de um bacilo circular, Gram-positivo, catalase-negativo, anaeróbio a microaerófilo, homofermentativo e que produz principalmente ácido láctico nos leites fermentados e iogurtes. São imóveis, esporulantes, ocorrendo isoladamente, em pares ou formando pequenas cadeias. Estes micro-organismos são fracos formadores de ácidos; apresentam bom desenvolvimento em valores de pH de 4,5 a 6,4 e temperatura entre 35 - 40°C, e pouco tolerante aos ambientes salinos. Grande parte das cepas degrada amidalina, celobiose, esculina, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose e sacarose. Os lactobacilos contribuem com o sabor e aroma em alimentos fermentados, produzindo vários compostos voláteis, como o diacetil e seus derivados (FRANCO; LANDGRAF; DESTRO, 1996; SHAH, 2001; PAULA, 2010).

O *L. acidophilus* apresenta elevado potencial probiótico, pois produz substâncias antimicrobianas. Em geral, a atividade antimicrobiana das BAL probióticas depende de uma série de fatores: os níveis de pH, a competição

por substrato e a capacidade de síntese de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. Pan e colaboradores (2009) verificaram ação antagonista de *L. acidophilus* NIT sobre alguns patógenos capazes de promover infecções, *Salmonella typhimurium* Typhimurium e *Clostridium difficile*.

Alguns estudos foram realizados, a fim de verificar a produção de compostos antimicrobianos por *L. acidophilus*. De Muynck e colaboradores (2004), ao utilizarem o teste de difusão em ágar com diferentes BAL probióticas sobre fungos deteriorantes, constataram que 75,0 % das culturas testadas apresentaram alguma atividade antifúngica. Kos e colaboradores (2008) usaram a mesma metodologia para avaliarem o comportamento *L. acidophilus* (M92). Essa cultura apresentou efeito antimicrobiano sobre *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*.

Tabasco e colaboradores (2009) demonstraram a capacidade antimicrobiana de *L. acidophilus* (La-5), devido à síntese da bacteriocina lactacina B. O La-5 quando associado em co-cultura àquelas tradicionais empregadas para fermentação de iogurtes (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*) foi induzida a produzir a substância antimicrobiana.

### **3.1.2.2 - *Lactobacillus casei***

Foi citado pela primeira vez no Japão, em 1935. Trata-se de um micro-organismo Gram-positivo, não esporulado, catalase negativo, em forma de bastonete, facultativo quanto ao requerimento de oxigênio, ácido tolerante e estritamente fermentativo. É um habitante comum do intestino delgado, sendo resistente à bile e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. É um micro-organismo homofermentativo facultativo, produzindo quase exclusivamente ácido láctico, embora possa produzir também acetaldeído (RAVULA; SHAH, 1998; ALONSO; ISAY, 2007; PAULA, 2010).

Yang e Clausen (2005) obtiveram uma redução de 95,0 - 100,0 % no desenvolvimento de fungos, quando em contato com *L. casei* e *L. acidophilus*. Além disso, ao separarem o sobrenadante, este apresentou algumas substâncias desconhecidas que exibiram atividade antifúngica. Esses

metabólitos apresentaram resistência ao aquecimento a 121°C/15 minutos e atividade após neutralização.

Osuntoki, Ejide e Omonigbehin (2008) isolaram espécies de *Lactobacillus* presentes em produtos lácteos fermentados e avaliaram a atividade inibitória sobre algumas espécies enteropatogênicas. *L. casei* apresentou ação inibitória mais eficiente sobre *L. monocytogenes* quando comparado com *S. enterica* Typhimurium.

#### 4 - Fungos leveduriformes

Os fungos leveduriformes são micro-organismos eucarióticos, unicelulares, classificados como ascomycetos ou basidiomicetos. Geralmente são células esféricas, ovais ou cilíndricas e a divisão celular é binária. Como características principais, apresentam capacidade de tolerância às baixas temperaturas, à acidez, à baixa atividade de água, à salinidade e a desinfetantes, fermentam a lactose e/ou a galactose, assimilam ácidos orgânicos, tais como o succínico, láctico e cítrico, possuem atividade proteolítica e lipolítica sobre a caseína e a gordura presentes no leite. Podem ser encontradas em produtos manufaturados que contêm gordura ou grande quantidade de açúcar, como os produtos lácteos (WALSTRA et al., 1999; JACQUES; CASAREGOLA, 2008; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Esses micro-organismos estão presentes em derivados lácteos pela ação de processos fermentativos, maturações ou deteriorações, podendo causar efeitos positivos ou negativos. Podem interagir com outros micro-organismos, por três diferentes meios (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996):

- Eliminando os indesejáveis ou patogênicos, podendo causar alterações na qualidade do produto;
- Inibindo a cultura iniciadora;
- Contribuindo positivamente no processo de fermentação e de maturação aliando-se à cultura iniciadora.

A contaminação durante o processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas, por fungos leveduriformes, pode estar relacionada à adição de

frutas, assim como práticas inadequadas de higiene durante o envase do produto. Os produtos lácteos, de maneira geral, oferecem condições adequadas para o desenvolvimento e predominância desses micro-organismos leveduriformes (REIS, 2008).

A presença desses micro-organismos, como por exemplo, de *Debaryomyces hansenii* e *Candida edax*, promove fermentação com formação de gás, resultando em sabores e odores desagradáveis, despigmentações, modificações na textura, formação de limo e sedimentos, deteriorando o produto e conseqüentemente, comprometendo a sua vida de prateleira (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008). Algumas espécies de fungos leveduriformes, como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, são patógenos oportunistas, podendo ser capazes de causar diversos tipos de infecções em indivíduos susceptíveis, como os imuno-comprometidos ou hospitalizados (JACQUES; CASAREGOLA, 2008), evidenciando a necessidade de intensificar os cuidados durante a seleção da matéria-prima, processamento dos alimentos, assim como na inspeção mais eficaz dos produtos (ARAÚJO et al., 2001).

Poucos estudos relatam interações positivas ou de protocooperação entre BAL probióticas e leveduriformes, sendo ainda pouco compreendidos (FERREIRA; VILJOEN, 2003). Acredita-se que para esse efeito ocorrer, os leveduriformes precisam alcançar elevadas densidades populacionais e, competir e/ou interagir com outros organismos presentes (WOUTERS et al., 2002).

A presença de fungos leveduriformes não é desejada nas bebidas lácteas fermentadas, pois sua deterioração pode ser decorrente da ação desses micro-organismos (JACQUES; CASAREGOLA, 2008). São várias as fontes de contaminação, desde a obtenção da matéria-prima até o produto final. Diversos fatores tornam o ambiente de produção propício para o desenvolvimento de leveduriformes nos produtos lácteos, dentre eles, destacam-se: qualidade da matéria-prima, condições do processamento, má higienização dos equipamentos, do ambiente, e dos manipuladores, a eficiência da pasteurização, além de ingredientes, como polpas de frutas e mel (VILJOEN et al., 2001). Em virtude de sua contaminação, o produto

caracteriza-se por um aroma de ácido acético associado ao sabor ácido (GUEDES NETO et al., 2003).

#### **4.1 - *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii***

O gênero *Cryptococcus* compõe espécies basidiomicetos, saprófitas, podendo sobreviver em ambientes pobres em nutrientes, além de serem resistentes à dessecação. Podem ser isolados do ar, solo, resíduos orgânicos e penas de animais, madeira em decomposição e alimentos, tais como queijos, frutas e vinho. Raramente são citados como patogênicos em humanos, no entanto, a incidência de infecção por este patógeno tem aumentado nos últimos 40 anos, sendo que *C. laurentii* e *C. albidus* juntos são responsáveis por 80,0 % dos casos relatados (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2007).

Borelli e colaboradores (2006) identificaram *C. albidus* na cultura selvagem para a produção de queijos artesanais na região da Serra da Canastra. Silva (2003), Mansor (2001), Reis (2008) identificaram *C. laurentii* e *C. albidus* ao analisarem amostras de queijo Minas Frescal, manteiga e bebida láctea, respectivamente.

#### **4.2 - *Candida edax***

*Candida edax* são fungos ascomicetos, geralmente isolados de solo, por isso cogita-se a possibilidade de sua transferência para plantas e delas para os frutos, sendo estes utilizados para o consumo. Estes micro-organismos produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas, fermentam a lactose e utilizam o ácido láctico. Trata-se de um micro-organismo não patogênico, que assimila maltose, galactose, sacarose, citrato e fermenta maltose, glucose e galactose (KURTZMAN; FELL, 1998; PRACHYAKIJ et al., 2007).

Kavas e colaboradores (2006) investigaram a ocorrência e o tipo de fungos leveduriformes em queijos e iogurtes produzidos na região da Turquia, constatando a presença de *Candida* sp. em todas as amostras analisadas.

De acordo com Reis (2008), como as bebidas lácteas fermentadas são acrescidas de polpas de frutas, provavelmente a presença da *C. edax* no produto seja pelo uso de frutos contaminados.

#### 4.3 - *Debaryomyces hansenii*

*Debaryomyces hansenii* é formado por um grupo heterogêneo, não patogênico, sendo osmo, halo e xerotolerantes, capaz de se desenvolver sob baixas temperaturas (5-10°C), sendo a ótima entre 20-25°C. São capazes de utilizar os ácidos láctico e cítrico, lactato, citrato e galactose, como substrato para seu desenvolvimento. Produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas, as quais metabolizam a gordura e as proteínas do leite. Sintetizam e toleram várias toxinas. Normalmente são encontrados em diversos ambientes, tais como: carnes, queijos, frutas, solo e produtos com altas concentrações de sal e açúcar, além de vinhos e cervejas (WELTHAGEN; VILJOEN, 1998; BARNETT, 2000).

Alguns cultivos de *D. hansenii* podem inibir o desenvolvimento de certos fungos, em simbiose com algumas BAL (WELTHAGEN; VILJOEN, 1998). Esse efeito inibidor é causado, principalmente, pelo abaixamento do valor de pH por ação das BAL e produção de álcool e gás carbônico pelos leveduriformes (BREUER; HARMS, 2006).

Paula (2010) observou protocooperação das culturas probióticas *L. acidophilus* (La-5) e *L. casei* (Lc-1) com alguns cultivos de *D. hansenii* variedade *fabryii*. Estudos relataram que *D. hansenii* favorecem o desenvolvimento de bactérias, pela produção de nutrientes, tais como vitaminas e aminoácidos (WOUTERS et al., 2002, BREUER; HARMS, 2006).

Apesar da presença desses micro-organismos em produtos lácteos fermentados, especialmente as bebidas lácteas, ser indesejável (BREUER; HARMS, 2006; JACQUES; CASAREGOLA, 2008), desempenham um papel importante na maturação de alguns tipos de queijos. Características como tolerância por sal, desenvolvimento em baixas temperaturas, e a habilidade de usar ácido láctico e cítrico como fontes de carbono fazem com que esse micro-organismo consiga sobreviver neste tipo de ambiente (WELTHAGEN; VILJOEN, 1998).

## 5 - Considerações finais

A qualidade das bebidas lácteas fermentadas pode ser assegurada adotando-se os requisitos básicos de Boas Práticas de Fabricação, a seleção de culturas lácticas probióticas produtoras de substâncias antagonistas, aumentando a segurança do produto, além de proporcionar efeitos terapêuticos aos consumidores.

Estudos sobre a conservação de alimentos pela produção de antimicrobianos naturais podem contribuir para o desenvolvimento tecnológico da indústria láctea nacional, pela geração de conhecimento sobre a interação entre a biota dos produtos lácteos fermentados, possibilitando a produção de alimentos seguros e saudáveis, com ampliação da vida útil.

## 6 - Referências bibliográficas

- ABO-AMER, A. E. Molecular characterization of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus acidophilus* AA11. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 54, n. 1, p. 107-119, 2007.
- AKUTSU, R. C. et al. Adequação das Boas Práticas de Fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 419-427, 2005.
- ALONSO, B.; ISAY, S. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, Caracas, v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.
- ÁLVAREZ-MARTÍN, P. et al. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 1-12, p. 62-70, 2008.
- ARAÚJO et al. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador - BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 10-14, 2001.
- BARBOSA, F. H. F. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 e *Bifidobacterium longum* Bb-46. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2001.
- BARNETT, J. A. A. History of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast**, Chichester, v. 16, n. 8, p. 755-771, 2000.

BISTROM, M.; NORDSTROM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Food Science & Technology**, Amsterdam, n. 11, v. 13, p. 372-379, 2002.

BOMBA, A. et al. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. **Food Science and Technology**, London, v. 13, n. 4, p. 121-126, 2002.

BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.

BOYLE, R. J.; TANG, M. L. K. The role of probiotics in the management of allergic disease. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 568-576, 2006.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção de iogurte. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, v. 4, n. 25, p. 24-38, 1997.

BRANDÃO, W. A. P. L. N. T. M. **Elaboração de bebida fermentada simbiótica de soro lácteo**. 70 f. 2007. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília, DF, atualizado em julho 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 09 fev. 2010.

BRASIL. Decreto-Lei n°. 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Rio de Janeiro, p. 10.785, 07 jul. 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resolução n°. 10 de 22 de maio de 2003. Aprova o programa genérico de procedimentos padrão de higiene operacional - PPHO, nos estabelecimentos de leite e derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 22 mai. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resolução RDC n°. 275 de 21 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 21 out. 2002(b).

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n°. 166, de 05 de maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p. 42, 06 maio 1998. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n°. 56, de 07 de dezembro de 1999. Submete a consulta pública os regulamentos técnicos de padrão de identidade e qualidade de leite. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p. 34, 08 dez. 1999. Seção 2.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°. 51, de 20 de setembro de 2002. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade dos leites cru e pasteurizado. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p. 13, 21 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n°. 3.088, de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo à mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado... **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 26 jun 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n°. 16 de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 24 ago. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°. 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 09 jan. 2002(a).

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n°. 1428, de 02 de dezembro de 1993. Aprova o controle de qualidade na área de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 02 dez. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n°. 326 de 30 de julho de 1997. Aprova o regulamento técnico sobre condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 01 agost. 1997(a).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n°. 368 de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores / industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 08 set. 1997(b).

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, Chichester, v. 23, n. 6, p. 415-437, 2006.

BROADBENT, J. R.; STEELE, J. L. Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 71, n. 3, p. 121-128, 2005.

BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria*

*monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

CALARGE, F. A.; SATOLO, E. G.; SATOLO, L. F. Aplicação do sistema de gestão da qualidade BPF (Boas Práticas de Fabricação) na indústria de produtos farmacêuticos veterinários. **Gestão da Produção**, São Carlos, v. 14, n. 2, p. 379-392, 2007.

CALDEIRA, L. A. et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2193-2198, 2010.

CALDERÓN, O. et al. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 57, n. 1, p. 51-56, 2007.

CANDY, D. C. A. et al. Probiotics for the young and the not so young. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 61, n. 3, p. 215-221, 2008.

CHEIKHYOUSSEF, A. et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1-12, p. 553-559, 2009.

CHEIKHYOUSSEF, A. et al. Bifidin I - a new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and partial amino acid sequence. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 1-11, p. 746-753, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. **Food hygiene basic texts**. 2nd ed. Rome; 2001.

COLLADO M.C.; HERNÁNDEZ, M.; SANZ, Y. Production of bacteriocin like inhibitory compounds by potentially probiotic bifidobacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 5, p. 34-40, 2005.

CRUCHET, S. et al. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. **Nutrition**, New York, v. 19, n. 9, p. 716-721, 2003.

DAHMER, A. M. **Avaliação da gestão da qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**. 2006. 218 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

DE MUYNCK, C. et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 1, p. 339-346, 2004.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Hethersett, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.

DERAZ, S. F. et al. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 34, n. 1-12, p. 373-379, 2007.

DUREK, C. M. **Verificação das Boas Práticas de Fabricação em indústrias de leite e derivados, registradas no Serviço de Inspeção Federal - SIF**. 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

EL-GHAISH et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, n. 2-3, p. 509-516, 2011.

FEIJÓ, L. D. et al. Caminhões de coleta a granel: monitoramento da qualidade do leite, da higienização do mangote e da superfície do caminhão tanque. In: XIX Congresso Nacional de Laticínios. 2002, Juiz de Fora - MG. **Anais...** Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002.

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

FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 12, p. 131-140, 2003.

FONTES, A. C. L. **Desenvolvimento e avaliação de bebida láctea tratada termicamente após fermentação**. 2007. 50 f. Dissertação (Magister Scientiae)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION - FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation for the probiotics in food. London, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

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, 2006.

FULLER, R. **Probiotics: their development and use**. In: OLD HERBORN UNIVERSITY SEMINAR MONOGRAPH, 1995, Herborn-Dill. Probiotics:

prospects of use in opportunistic infections. Herborn-Dill: Institute for Microbiology and Biochemistry, p. 01-08, 1995.

GALVÃO, L. P. Inovando em produtos lácteos através de conceitos nutricionais. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 40, p. 42-44, 2002.

GENTA, T. M. S.; MAURÍCIO, A. A.; MATIOLI, G. Avaliação das Boas Práticas através de *check-list* aplicado em restaurantes self-service da região central de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 151-156, 2005.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2011. 1034 p.

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**, Guildford, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GRANATO et al. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

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

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Pondicherry, v. 27, n. 3, p. 202-209, 2009.

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research of Technology**, Berlin, v. 227, n. 1-6, p. 07-15, 2008.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São Paulo, n. 9, p. 23-30, 2001.

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IZQUIERDO, E. et al. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 16-20, 2009.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 89, p. 755-768, 1996.

JAMUNA, M.; JEEVARATNAM, K. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of bacteriocins. **Journal of General and Applied Microbiology**, Bunkyo, v. 50, n. 2, p. 79-90, 2004.

KARAMAN, A. D. et al. Barriers and benefits of the implementation of food safety management systems among the Turkish dairy industry: A case study. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 732-739, 2012.

KAVAS, G. et al. Characterization of yeasts isolated from artisanal Turkish dairy products. **International Journal of Dairy Sciences**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2006.

KEMPKA, A. P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, Supl., p. 170-177, 2008.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A; MUNDY, L. M. Nonneoformans cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, Munchen, v. 35, n. 2, p. 50-58, 2007.

KOS, B. et al. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 699-707, 2008.

KRUG, E. E. B. Qualidade do leite: quem ganha com a Instrução Normativa nº. 51. 2007. Disponível em <<http://milkpoint.com.br>>. Acesso em janeiro de 2008.

KURMANN, J. A. Os fatores biológicos e técnicos da fabricação do iogurte. In: Congresso Nacional de Laticínios, 4, Juiz de Fora, 1977, **Anais...**, p. 74-84.

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

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components. **Pharmacological Research**, London, v. 61, n. 13, p. 219-225, 2010.

LIMA, S. M. C. G. **Desenvolvimento de uma bebida láctea à base de soro de queijo, fortificada com ferro**. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação 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. **Milkbizz Tecnologia Temático**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 4-11, 2002.

LOPES, E. **Guia para elaboração dos procedimentos operacionais padronizados exigidos pela RDC nº. 275 da ANVISA**. São Paulo: Varela, 2004. 236 p.

LOVATTI, R. C. C. Gestão da qualidade em alimentos: uma abordagem prática. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 125, p. 90-93, 2004.

LUIZ, L. M. P. **Avaliação do envase à quente de uma bebida láctea na conservação a temperatura ambiente**. 2008. 70 f. Dissertação (Magister Scientiae)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 12 ed. São Paulo: Pearson - Prentice Hall, 2010. 608 p.

MADRONA, G. S.; PIOLA, M. M.; TERRA, C. O. Qualidade em laticínios: análise do conhecimento de colaboradores de um pequeno laticínio sobre o assunto. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 477-486, 2009.

MADUREIRA, F. C. P. **Desenvolvimento de uma bebida láctea funcional**. 2004. 173 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação 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, 2005.

MANSOR, A. P. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de manteiga**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

MARCHIORI, E. Alto valor agregado. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 65, p. 10-13, 2006.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**, Hilversum, v. 9, n. 2, p. 175-191, 2003.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. **Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/Artigos/20083/bacteriocinas/index.htm>>. Acesso em: 15/05/2012.

NADA, S. et al. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 728-731, 2012.

NAGPAL, R. Potential of probiotic and prebiotics for synbiotic functional dairy foods: an overview. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, Coppel, v. 2, n. 2-3, p. 75-84, 2007.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 1, p. 121-126, 1999.

NASCIMENTO, G. A.; BARBOSA, J. S. BPF - Boas Práticas de Fabricação: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 148, p. 24-30, 2007.

NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

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.

OLIVEIRA, M. N. Probióticos: seus benefícios à saúde humana. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo, v. 7, n. 87, p. 1-6, 2008.

OLIVEIRA, R. A. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA, V.M. **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

OSUNTOKI, A. A.; EJIDE, O. R.; OMONIGBEHIN, E. A. Antagonistic effects on enteropathogens and plasmid analysis of *Lactobacilli* isolated from fermented dairy products. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 7, n. 2, p. 311-316, 2008.

PAN, X. et al. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1-12, p. 598-602, 2009.

PAPADEMAS, P., BINTSIS, T. Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: a review. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, n. 1-4, p. 1-15, 2010.

PARADA, J. L. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 1-6, p. 521-542, 2007.

PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PAULA, A. T. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 3, p. 221-227, 2007.

PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas. In: VENTURIM FILHO, W. G. **Bebidas lácteas não alcoólicas**. Vol. 2. São Paulo: Edgar Blucher, 2010. p. 89-119.

PENNA, A. L. B.; ALMEIDA, K. E.; OLIVEIRA, M. N. Soro de leite: importância biológica, comercial e industrial – Principais produtos. In: OLIVEIRA, M. N. Tecnologia de Produtos lácteos funcionais. São Paulo: Atheneu. 2009. p. 251-276.

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)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus* contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela, 2005. 95 p.

PINTADO, M. E. et al. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001.

PRACHYAKIJ, P. et al. Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages, **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 29, n. 2, p. 211-218, 2007. Suplemento.

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

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurt and fermented milk drinks. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 12, n. 11, p. 819-822, 1998.

REIS et al. **Probióticos e seus efeitos terapêuticos na saúde humana**. Coleção Séries. Laboratório Editorial IBILCE, Campus UNESP, São José do Rio Preto. 96 p. 2011.

REIS, J. A. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em bebidas lácteas fermentadas, adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

RIBEIRO-FURTINI, L. L.; ABREU, L. R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 358-363, 2006.

ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook**. New York: Wiley-Interscience, 2002. 765 p.

RODGERS, S. Novel applications of live bacteria in food-services: probiotics and protective cultures. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 188-197, 2008.

ROPKINS, K.; BECK, A. J. Evaluation of worldwide approaches to the use of HACCP to control food safety. **Food Science & Technology**, London, v. 11, n. 1, p. 10-21, 2000.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

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.

SANTOS, C. T. et al. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 19, n. 1, p. 55-60, 2008.

SANTOSA, S.; FARNWORTH, E.; JONES, P. J. H. Probiotics and their potential health claims. **Nutrition Reviews**, New York, v. 64, n. 6, p. 265-274, 2006.

SANZ, Y.; COLLADO, M. C.; DALMAU, J. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. **Acta Pediátrica Española**, Madrid, v. 64, n. 1, p. 74-78, 2006.

SAVADOGO, A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a mini review. **African Journal of Biotechnology**, Johannesburg, v. 5, n. 9, p. 678-683, 2006.

SCALCO, A. R.; TOLEDO, J. C. Um modelo para gerenciar a qualidade na cadeia de produção do leite. **XXII Encontro Nacional de Engenharia de Produção - ENEGEP**, 2002, Curitiba, 23 a 25 de outubro de 2002.

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

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

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.

SHIHATA, H. S.; SHAH, N. P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 9, p. 765-772, 2002.

SILVA, J. V. **Qualidade microbiológica de ricota e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo Minas Frescal**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

STAVRIDIS, R. Capacitação de equipes operacionais em BPF na indústria alimentícia. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 116, p. 25-27, 2008.

STRINGHETA, P. C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SZWAJKOWSKA, M. et al. Bovine milk protein as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system - a review. **Animal Science Papers**, Jastrzebiec, v. 29, n. 4, p. 269-280, 2011.

TABASCO, R. et al. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 2-3, p. 109-116, 2009.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 3 ed. England: Woodhead Publishing Limited, 2007, 834 p.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K.; LATRILLE, E. Yoghurt and other fermented milks. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A. **Mechanization and Automation in Dairy Technology**. Reading: Sheffield Academic, 2001. Cap. 11, p. 296-317.

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, 2006.

TOLEDO, J. C.; BATALHA, M. A.; AMARAL, D. C. Qualidade na indústria agroalimentar: situação atual e perspectivas. **Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 90-101, 2000.

TOMICH, R. G. P. et al. Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 115-120, 2005.

TUOMINEN, P. et al. Trapping the food safety performance of a small or medium-sized food company using a risk-based model. **Food Control**, Guildford, v.14, n. 8, p. 573-578, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2009. Disponível em: <<http://www.usda.gov.br>> Acesso em junho de 2009.

VALLIN, V. N. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and dairy products technology chemistry and microbiology**. Gadhersburg: Aspen Publication, 2001. 451 p.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VÁSQUEZ, A. et al. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

VAUGHAN, E. E. et al. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **Journal of Applied Bacteriological**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 118-123, 1994.

VILJOEN, B. C. et al. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 12, p. 37-44, 2001.

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. New York: Marcel Dekker, 1999. 727 p.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2 ed. New York: CRC Press, 2006. 782 p.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 185-194, 1998.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 23, p. 91-109, 2002.

YANG, V. W.; CLAUSEN, C. A. Determining the suitability of lactobacilli antifungal metabolites for inhibiting mould growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 67, p. 977-981, 2005.

ZAMFIR, M. et al. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 190, n. 2, p. 305-308, 2000.

## **CAPÍTULO II**

**Relação entre adequação de Boas Práticas de  
Fabricação (BPF) e a evolução da microbiota na  
fabricação de bebidas lácteas fermentadas**

## RESUMO

A fim de garantir a segurança de um produto, as indústrias têm utilizado ferramentas de gestão de qualidade, como a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF). Embora considerado simples, o processo de fabricação de bebidas lácteas pode estar sujeito a fontes de contaminação de origem microbiana. A presença de fungos leveduriformes é indesejável, pois promovem alterações, comprometendo a vida útil do produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação das BPF em dois laticínios (A e B) produtores de bebidas lácteas fermentadas, por meio de uma lista de verificação baseada na Resolução RDC nº. 275 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e relacionar com a qualidade do produto acabado; além de caracterizar a evolução da microbiota das amostras coletadas nos laticínios, durante as etapas do processamento de bebidas lácteas fermentadas, assim como do produto acabado em diferentes tempos de estocagem. Foi realizada a contagem total das bactérias acidoláticas (BAL) e a enumeração de fungos leveduriformes. Avaliadas as BPF, o laticínio A apresentou-se com 96,95 % de cumprimento aos itens exigidos pela legislação, enquanto o B atendeu a 49,39 % dos itens. A população das BAL das amostras, de ambos os laticínios avaliados, apresentaram contagens superiores a  $10^6$  UFC/mL, portanto, em acordo com os padrões legais vigentes. No laticínio A, baixas contagens de fungos leveduriformes foram constatadas apenas nas amostras de leite cru e nas adicionadas de soro, açúcar e estabilizante. A partir da etapa da adição da cultura láctica, as amostras não apresentaram contaminação por fungos. As amostras do laticínio B apresentaram elevados níveis de contaminação por fungos leveduriformes, até os 60 dias de estocagem. Os elevados índices de contaminação estão relacionados às condições estruturais e sanitárias deficientes durante o processamento, ou ainda a utilização de matérias-primas contaminadas, comprometendo a qualidade do produto final. Fica evidente a necessidade de implantação de medidas preventivas de higiene, assim como o controle rigoroso em todas as etapas do processo de fabricação, desde a seleção das matérias-primas, processamento, estocagem e distribuição do produto.

**Palavras-chave:** Segurança dos alimentos, Qualidade microbiológica, Bactérias acidoláticas, Fungos leveduriformes.

## 1 - Introdução

Com o desenvolvimento do mercado lácteo, torna-se imprescindível criar um diferencial competitivo entre as empresas, por meio da melhoria da qualidade dos produtos assim como dos serviços oferecidos. Apesar da existência de programas de qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) na produção dos derivados lácteos, muitos destes podem sofrer contaminações de origem microbiana, durante o seu processamento, podendo resultar em alterações indesejáveis no produto final.

Entre os vários problemas encontrados na cadeia produtiva do leite, estão os relacionados às condições precárias de produção, conservação e estocagem, além de inúmeras fraudes que adulteram o produto exposto à venda (PUGA, 2008).

Borges e colaboradores (2008) monitoraram as condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. Foram detectadas espécies de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico e a presença de enterotoxinas.

Para assegurar a qualidade dos produtos lácteos, de modo a garantir a segurança do consumidor, devem ser adotadas medidas de prevenção e controle em todas as etapas da cadeia produtiva. Por razões relacionadas à amostragem, metodologia e distribuição de micro-organismos, a análise microbiológica, por si só, não garante a segurança do produto final. Este aspecto é garantido pela implementação de medidas preventivas, tais como o cumprimento das BPF e a aplicação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), constituindo as análises microbiológicas como parte do sistema.

Vallin e colaboradores (2009) avaliaram a eficiência da implantação de BPF em propriedades com ordenha manual e mecânica. Foram analisadas 46 amostras de leite cru, sendo 32 de propriedades com ordenha manual e 14 com ordenha mecânica, de 19 municípios da região central do Paraná. Após a implantação das BPF, os autores observaram uma significativa redução na contagem bacteriana total e de células somáticas nas amostras. As práticas implantadas se mostraram eficientes nos diferentes sistemas de produção. Nada e colaboradores (2012) avaliaram a aplicação das medidas de segurança, sobre a qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado, em

um grande pólo laticinista na Sérvia, por um período de quatro anos. Medidas como investimentos na formação dos agricultores, na infra-estrutura, nos pontos de coleta de leite cru, transporte, melhoria da higiene e redução do número de pequenos agricultores, foram empregadas; resultando em baixas contagens totais de micro-organismos no leite cru, observadas ao longo do tempo. As melhorias investidas em toda a cadeia produtiva melhoraram a qualidade do leite cru e do pasteurizado.

Apesar da simplicidade e de todas as inovações tecnológicas, o processamento das bebidas lácteas fermentadas pode estar sujeito a inúmeras fontes de contaminação, quando não atendidas às condições básicas de higiene. 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, pois determinará se o produto está apto para o consumo.

A presença de fungos leveduriformes é considerada indesejável em muitos derivados lácteos, especialmente em bebidas lácteas fermentadas, por promover a sua deterioração, resultante de alterações depreciativas e do comprometimento de sua vida de prateleira. Alguns estudos relataram a ocorrência desses micro-organismos em derivados lácteos (KAVAS et al., 2006; LOPANDIC et al., 2006; TORKAR; VENGUST, 2008; COSTA et al., 2008).

Apesar de diversos estudos disponíveis na literatura sobre a implantação de programas de segurança alimentar e da qualidade microbiológica de produtos alimentícios, desconhece-se estudos que relacionam a adequação das BPF no processo de fabricação de bebidas lácteas com a microbiota contaminante.

Neste contexto, o presente estudo tem os objetivos: avaliar a adequação das BPF em dois laticínios (A e B) produtores de bebidas lácteas fermentadas, por meio de uma lista de verificação baseada na Resolução RDC nº. 275 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e relacionar com a qualidade do produto acabado; além de caracterizar a evolução da microbiota das amostras coletadas nos laticínios, durante as etapas do processamento de bebidas lácteas fermentadas, assim como do produto acabado em diferentes tempos de estocagem, por meio da contagem total das BAL e da enumeração de fungos leveduriformes.

## **2 - Materiais e métodos**

### **2.1 - Avaliação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) nos laticínios produtores de bebidas lácteas fermentadas**

Para o presente trabalho foram selecionados dois laticínios (A e B), ambos localizados na região de São José do Rio Preto, cujos produtos foram previamente avaliados por REIS (2008), com resultados satisfatórios e insatisfatórios, respectivamente, sob o ponto de vista higiênico-sanitário.

Para a avaliação da adequação das BPF, foi utilizada a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos, que consta do Anexo II da Resolução RDC n. 275 de 21 de outubro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

O preenchimento da Lista de Verificação foi realizado durante três visitas aos laticínios, por meio de observações e por informações obtidas pelos responsáveis técnicos considerando, edificação e instalações, equipamentos, móveis e utensílios, manipuladores, produção e transporte do alimento e documentação, totalizando 164 itens de verificação, como descrito no Quadro 1 (Anexo A). A partir dos dados obtidos, foi calculado o percentual de conformidade aos requisitos exigidos pela legislação. Os resultados foram classificados em: Grupo 1: 100,0 - 76,0 % de atendimento aos itens, Grupo 2: 75,0 - 51,0 % e Grupo 3: 50,0 - 0,0 % (BRASIL, 2002).

### **2.2 - Obtenção e preparo das amostras**

Foram realizadas três coletas de amostras em cada laticínio avaliado, entre os meses de março e abril de 2009 no laticínio A e, no mesmo período do ano subsequente, no laticínio B. De acordo com o laticínio (A ou B) e o número das coletas (1, 2 ou 3), as amostras foram identificadas como, A1, A2 e A3 para o laticínio A e B1, B2 e B3 para o laticínio B, seguidas da etapa de coleta (Tabela 1).

Para os laticínios avaliados, o processamento de bebidas lácteas fermentadas era realizado no período noturno, devido à utilização diurna dos equipamentos comuns ao beneficiamento do leite.

**Tabela 1** - Identificação das amostras coletadas em diferentes etapas de fabricação de bebidas lácteas fermentadas.

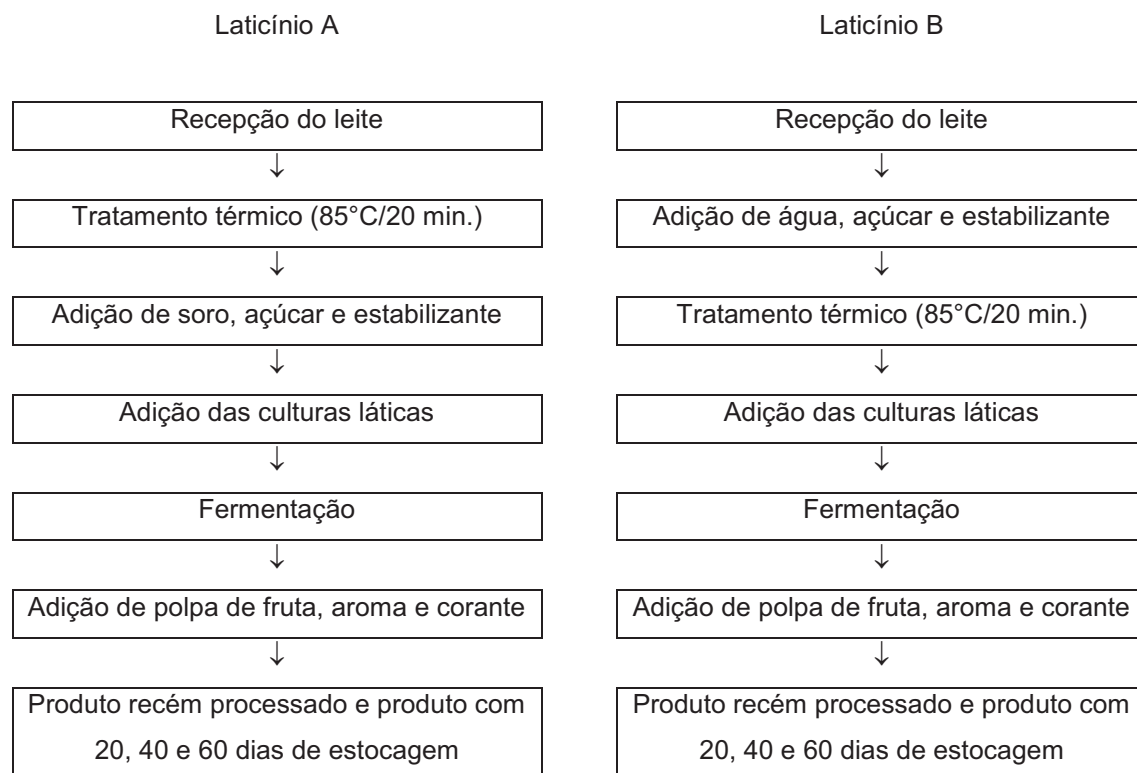
| Etapas do processo de fabricação |                                             | Laticínios |       |
|----------------------------------|---------------------------------------------|------------|-------|
| 1                                | Recepção do leite                           | Ax 1       | Bx 1  |
| 2                                | Tratamento térmico                          | Ax 2       | Bx 3  |
| 3                                | Adição de soro/água, açúcar e estabilizante | Ax 3       | Bx 2  |
| 4                                | Adição da cultura láctea                    | Ax 4       | Bx 4  |
| 5                                | Fermentação                                 | Ax 5       | Bx 5  |
| 6                                | Adição de polpas de frutas                  | Ax 6       | Bx 6  |
| 7                                | Produto recém processado                    | Ax 7       | Bx 7  |
| 8                                | 20 dias de fabricação                       | Ax 8       | Bx 8  |
| 9                                | 40 dias de fabricação                       | Ax 9       | Bx 9  |
| 10                               | 60 dias de fabricação                       | Ax 10      | Bx 10 |

**Legenda:** x = número da coleta (1, 2 ou 3)

As coletas das amostras foram realizadas de forma asséptica, com o auxílio de uma pinça com gaze na extremidade, umidificado com álcool e álcool 70,0 % para a assepsia das mãos. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis.

A Figura 1 ilustra as etapas das quais as amostras foram coletadas, totalizando 10 amostras por coleta, perfazendo 30 amostras por laticínio avaliado. Contudo, as etapas do processamento de ambos os laticínios, não apresentaram um padrão sequencial.

O laticínio B substituiu o soro de leite por água, para o preparo da mistura a ser fermentada. A água utilizada adivinha de um poço localizado no próprio laticínio, a poucos quilômetros da linha de beneficiamento.



**Figura 1** - Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas e etapas nas quais as amostras foram coletadas nos laticínios A e B.

Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em caixas de material isotérmico contendo gel reciclável e transportadas de imediato para o Laboratório de Leite e Derivados UNESP - Campus de São José do Rio Preto para análise. A seguir, assepticamente 10,0 mL de cada amostra foram colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90,0 mL água peptonada (0,1 %) estéril (diluição  $10^{-1}$ ), com posterior agitação. A partir desta, foram realizadas as demais diluições decimais seriadas, utilizando-se o mesmo diluente. As diluições obtidas foram utilizadas, conforme o ensaio (HARRIGAN; MC CANCE, 1976; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1978).

## **2.3 - Caracterização microbiológica das amostras**

### **2.3.1 - Contagem total de bactérias lácticas no produto acabado**

Das amostras, em duplicata, foi inoculado assepticamente 1,0 mL das diluições  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$  em placas de Petri esterilizadas e identificadas, contendo De Man Rogosa Sharp (MRS) ágar (Acumedia). Após completa solidificação, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sob anaerobiose (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF, 1997). O resultado obtido em cada placa foi multiplicado pela recíproca da diluição e o valor expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro da amostra (UFC/mL) (ICMSF, 1978, 1980). As UFC's obtidas foram transformadas em logaritmo de base 10.

### **2.3.2 - Enumeração de fungos leveduriformes**

Para as amostras coletadas foi empregado o método rápido em meio cromogênico Compact dry<sup>®</sup> YM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), utilizando-se assepticamente 1,0 mL das amostras puras ( $10^0$ ) e das diluições  $10^{-3}$ , exceto para o leite cru, onde foram empregadas  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$ , em duplicata. As placas foram incubadas a 25°C por 120 horas. Os resultados obtidos em cada placa foram multiplicados pela recíproca da diluição, expressos em UFC/mL e transformados em logaritmo de base 10.

A fim de se realizar o isolamento das colônias, foi utilizado o método de inoculação por profundidade em Meio Para Levedura ou ágar MPL (2,0 % de glicose, 0,5 % de extrato de levedura, 1,0 % de cloreto de sódio, 0,23 % de fosfato de sódio monobásico, 0,5 % de sulfato de amônio e 2,0 % de ágar), segundo *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* - ICMSF (1978). Foram empregadas as diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$ , em duplicata. Após solidificação as placas foram incubadas em estufa a 25°C por 120 horas. As UFC's foram calculadas de acordo com as diluições (ICMSF, 1978) e transformadas em logaritmo de base 10.

## **2.4 - Caracterização físico-química das amostras do laticínio B**

Inicialmente os objetivos deste estudo relacionavam-se apenas a qualidade microbiológica, ou seja, a viabilidade das BAL no produto acabado e a enumeração dos fungos leveduriformes. Porém, por meio da avaliação das BPF realizada no laticínio B e, ao constatar-se que o mesmo substituíra a adição de soro de leite por água, optou-se por realizar as análises de teor de Sólidos totais, pH e Acidez titulável, a fim de verificar possíveis alterações, durante a vida de prateleira do produto. Como as coletas das amostras no laticínio A já haviam sido realizadas, essas análises foram realizadas apenas para as amostras do laticínio B.

As análises foram realizadas de acordo com as seguintes metodologias:

- pH: mensurado com o auxílio de um pHmetro nos diferentes tempos de armazenamento (INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL, 2008);
- Acidez titulável: por meio da titulação ácido-alcalimétrica, usando-se fenolftaleína como indicador (IAL, 2008);
- Teor de sólidos totais: determinado por meio da secagem da amostra em estufa a vácuo, a 70°C por 24 horas (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985);

## **3 - Resultados e discussão**

### **3.1 - Avaliação das BPF nos laticínios produtores de bebidas lácteas**

A partir do preenchimento da lista de verificação (Tabela 2), o Laticínio A cumpriu com 159 dos 164 itens exigidos, ou seja, apresentou 96,95 % de conformidade com o prescrito pela legislação (BRASIL, 2002), sendo classificado como Grupo 1, por apresentar entre 76,0 e 100,0 % de atendimentos aos itens. O laticínio B atendeu apenas a 81 dos 164 itens avaliados, isto é, com 49,39 % dos itens em conformidade com a legislação vigente, sendo classificado como Grupo 3, por apresentar até 50,0 % de atendimento aos itens.

**Tabela 2** - Distribuição dos itens em conformidade nos laticínios A e B.

| <b>Lista de Verificação das BPF</b>                                      | <b>Número total de requisitos</b> | <b>Laticínio A</b> | <b>Laticínio B</b> |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>1. Edificações e instalações</b>                                      | <b>79</b>                         | <b>74</b>          | <b>34</b>          |
| 1.1. Área externa                                                        | 2                                 | 2                  | 1                  |
| 1.2. Acesso                                                              | 1                                 | 1                  | 1                  |
| 1.3. Área interna                                                        | 1                                 | 1                  | 1                  |
| 1.4. Piso                                                                | 3                                 | 3                  | 2                  |
| 1.5. Teto                                                                | 2                                 | 1                  | 1                  |
| 1.6. Paredes e divisórias                                                | 3                                 | 2                  | 1                  |
| 1.7. Paredes                                                             | 3                                 | 1                  | 1                  |
| 1.8. Janelas e outras aberturas                                          | 3                                 | 3                  | 1                  |
| 1.9. Escadas, elevadores de serviço, montacargas e estruturas auxiliares | 2                                 | 2                  | 2                  |
| 1.10. Instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores          | 15                                | 15                 | 6                  |
| 1.11. Instalações sanitárias para visitantes e outros                    | 1                                 | 1                  | 0-                 |
| 1.12. Lavatórios na área da produção                                     | 2                                 | 2                  | 2                  |
| 1.13. Iluminação e instalação elétrica                                   | 3                                 | 3                  | 2                  |
| 1.14. Ventilação e climatização                                          | 7                                 | 7                  | 1                  |
| 1.15. Higienização das instalações                                       | 9                                 | 9                  | 3                  |
| 1.16. Controle integrado de vetores e pragas urbanas                     | 3                                 | 3                  | 2                  |
| 1.17. Abastecimento de água                                              | 13                                | 12                 | 1                  |

**Tabela 2** - Distribuição dos itens em conformidade nos laticínios A e B (continuação).

| <b>Lista de Verificação das BPF</b>                                   | <b>Número total de requisitos</b> | <b>Laticínio A</b> | <b>Laticínio B</b> |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|
| 1.18. Manejo de resíduos                                              | 3                                 | 3                  | 3                  |
| 1.19. Esgotamento sanitário                                           | 1                                 | 1                  | 1                  |
| 1.20. Leiaute                                                         | 2                                 | 2                  | 2                  |
| <b>2. Equipamentos, móveis e utensílios</b>                           | <b>21</b>                         | <b>21</b>          | <b>14</b>          |
| 2.1. Equipamentos                                                     | 8                                 | 8                  | 6                  |
| 2.2. Móveis (mesas, bancadas, vitrines, estantes)                     | 2                                 | 2                  | 2                  |
| 2.3. Utensílios                                                       | 2                                 | 2                  | 1                  |
| 2.4. Higienização dos equipamentos e maquinários, móveis e utensílios | 9                                 | 9                  | 5                  |
| <b>3. Manipuladores</b>                                               | <b>14</b>                         | <b>14</b>          | <b>9</b>           |
| 3.1. Vestuário                                                        | 3                                 | 3                  | 3                  |
| 3.2. Hábitos higiênicos                                               | 3                                 | 3                  | 2                  |
| 3.3. Estado de saúde                                                  | 1                                 | 1                  | 1                  |
| 3.4. Programa de controle de saúde                                    | 2                                 | 2                  | 2                  |
| 3.5. Equipamento de proteção individual                               | 1                                 | 1                  | 1                  |
| 3.6. Programa de capacitação dos manipuladores e supervisão           | 4                                 | 4                  | 0                  |

**Tabela 2** - Distribuição dos itens em conformidade nos laticínios A e B (continuação).

| <b>Lista de Verificação das BPF</b>             | <b>Número total de requisitos</b> | <b>Laticínio A</b> | <b>Laticínio B</b> |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>4. Produção e transporte do alimento</b>     | 33                                | 33                 | 22                 |
| 4.1. Matéria-prima, ingredientes e embalagens   | 11                                | 11                 | 7                  |
| 4.2. Fluxo de produção                          | 4                                 | 4                  | 2                  |
| 4.3. Rotulagem e armazenamento do produto final | 9                                 | 9                  | 6                  |
| 4.4. Controle de qualidade do produto final     | 4                                 | 4                  | 2                  |
| 4.5. Transporte do produto final                | 5                                 | 5                  | 5                  |
| <b>5. Documentação</b>                          | 17                                | 17                 | 2                  |
| Manual de Boas Práticas de Fabricação           | 1                                 | 1                  | 0                  |
| Procedimentos Operacionais Padronizados         | 16                                | 16                 | 2                  |
| <b>Número total de requisitos</b>               | 164 (100%)                        | 164 (100%)         | 164 (100%)         |
| <b>Número total de conformidades</b>            | -                                 | 159 (96,95%)       | 81 (49,39%)        |
| <b>Número total de não conformidades</b>        | -                                 | 5 (3,05%)          | 83 (50,61%)        |

O laticínio A passava por um processo de reforma, no momento das visitas de inspeção e coletas, provavelmente este seja o motivo pelo qual 5 itens foram considerados não conformes (3,05 %) com o estabelecido pela legislação (BRASIL, 2002). Especificamente, as não conformidades relacionavam-se: ao inadequado estado de conservação de tetos, paredes e divisórias, devido à presença de umidade e descascamento; a ausência de portas externas com fechamento automático (mola, sistema elétrico e outro), e à presença de pontos de infiltração, devido ao inadequado estado de conservação do encanamento. Aproximadamente 4 meses após a realização deste estudo, uma nova visita foi realizada, onde foi constatado o total cumprimento das BFP.

Avaliadas as BPF e as condições estruturais, ambientais e humanas, o laticínio A apresentou grande potencial para a produção de um alimento de qualidade, seguro e que atenda as expectativas e exigências dos consumidores. Diferentemente do laticínio B, com práticas inadequadas das BPF. As falhas na aplicação das BPF acarretam grande probabilidade de contaminação aos alimentos processados. Investimentos na formação dos produtores, na infra-estrutura, nos pontos de coleta de leite cru, no transporte e na melhoria da higiene, assim como, na conscientização dos manipuladores e funcionários, resultam na melhoria da qualidade dos produtos (NADA et al., 2012).

No laticínio B, foram detectadas as seguintes falhas: ausência de telas, permitindo o livre acesso de insetos e animais; focos de poeira e acúmulo de água estagnada; piso com drenagem inadequada, promovendo o acúmulo de resíduos; tetos, paredes, janelas e divisórias em inadequado estado de conservação, devido à presença de umidade, bolores e rachaduras; inexistência de cantos arredondados entre paredes e piso, e paredes e teto; instalações sanitárias em proporção inadequada ao número de empregados; portas com fechamento manual; pisos e paredes em inadequado estado de conservação; ausência de avisos com procedimentos para lavagem correta das mãos; ausência de instalações sanitárias para visitantes; ventilação e iluminação inadequadas; ausência de um responsável comprovadamente capacitado para operar a higienização das instalações e de registros da higienização; ausência de um controle de qualidade da água utilizada em toda

a linha de produção; ausência de registros que comprovem a manutenção preventiva dos equipamentos e a de calibração de instrumentos; utensílios armazenados em locais impróprios, de forma desorganizada e desprotegidos de contaminação; inexistência de um programa de capacitação adequado e contínuo relacionado à higiene pessoal e à manipulação de alimentos; critérios para a seleção das matérias-primas não são baseados na segurança dos alimentos; inexistência do manual de BPF, assim como de Procedimentos Operacionais Padronizados (POP).

Dahmer (2006) avaliou a gestão da qualidade em laticínios (47,0 %) e usinas de beneficiamento de leite (53,0 %), em 66 unidades industriais de leite avaliadas, no Estado de Mato Grosso do Sul. Foram observados alguns parâmetros: a relação das indústrias com seus produtores - 75,8 % das empresas não oferecem programas de assistência técnica aos produtores e treinamento para os fornecedores de leite - 59,1 % das empresas não desenvolveram treinamentos. Por fim, foram identificadas certas anormalidades no leite, ligada à sua origem, segundo as indústrias de laticínios; a principal é a acidez, seguida da aguagem, sujidades, sangue, urina e leite colostrado, indicadores de falta de higiene, e, sobretudo, a falta de compromisso com o consumidor.

Com o objetivo de verificar as condições higiênico-sanitárias de uma linha de produção de queijo coalho, Borges e colaboradores (2008) constataram elevados índices de contaminação por patógenos e a presença de enterotoxinas estafilocócicas. Estes contaminantes, quando presentes no leite cru, não são inativadas pelo processo de pasteurização, permanecendo no leite pasteurizado, na coalhada e, conseqüentemente, no queijo. Os autores alegaram que tal ocorrido foi resultante de falhas na aplicação das BPF desde a obtenção do leite até o produto final.

Madrona, Piola e Terra (2009) avaliaram os manipuladores de um pequeno laticínio localizado na área rural da cidade de Marialva, PR, usando um questionário para as diferentes funções operacionais, sendo elas: queijeiro, empacotador, auxiliar de produção, encarregado de higienização das caixas e gerente de produção. O questionário foi confeccionado com doze questões sobre qualidade e segurança em laticínios e seus produtos. De uma maneira geral, os manipuladores tinham conhecimento sobre os padrões essenciais de

qualidade, como a importância da pasteurização do leite para o seu processamento, devendo ser de boa qualidade e que este fato está relacionado diretamente às BPF, entretanto desconheciam a diferença entre os tipos de perigos encontrados na indústria (físicos, químicos e biológicos).

### 3.2 - Caracterização microbiológica das amostras

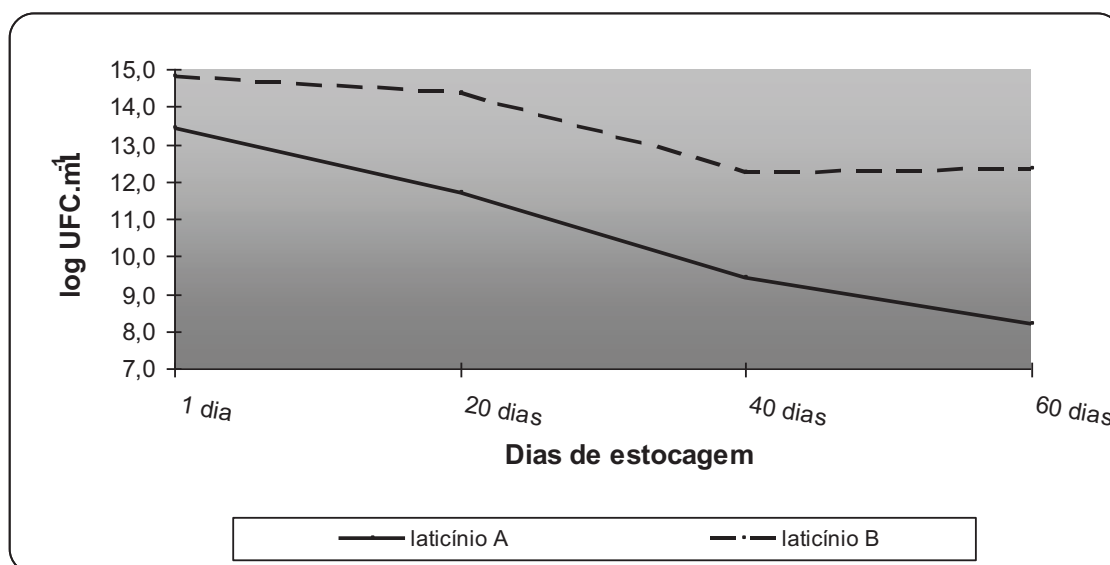
#### 3.2.1 - Viabilidade da microbiota láctica

A contagem total de bactérias ácidoláticas (BAL) nas amostras de bebidas lácteas fermentadas recém processadas, com 20, 40 e 60 dias de estocagem, provenientes das três coletas e de ambos os laticínios avaliados, foi superior a  $10^6$  UFC/mL, ou seja, em acordo com o prescrito pela legislação (BRASIL, 2005).

Houve perda da viabilidade das BAL durante a estocagem refrigerada, com valores entre 13,42 e 8,17 log UFC.mL<sup>-1</sup>, e 14,79 e 12,71 log UFC.mL<sup>-1</sup>, para as bebidas lácteas dos laticínios A e B, respectivamente. A população de BAL nas amostras do laticínio A foi aproximadamente dois ciclos logarítmicos inferiores àquelas do laticínio B (Figura 2).

As culturas lácticas, empregadas para a fermentação das bebidas tanto no laticínio A quanto no B, são aquelas tradicionais do processo de fabricação de iogurtes, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, de origem comercial, liofilizadas e em embalagens individuais (25,0 g) para o uso direto. De acordo com informações obtidas durante as visitas no laticínio B, mas principalmente por constatações no próprio local, a cultura láctea liofilizada não era empregada corretamente, na proporção recomendada pelo fabricante, ou seja, um envelope deveria ser suspenso em 10.000 litros na “base láctea” (“leite/água”), no entanto, um envelope foi utilizado para a fermentação de 8.000 litros da mistura, o que justifica a elevada população de BAL no produto coletado no laticínio B, quando comparada a do laticínio A. Além disso, o meio de cultivo utilizado para verificar a viabilidade láctea não era seletivo para as bactérias da cultura, ou seja, poderia permitir o desenvolvimento de espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, entre outros. Os resultados obtidos também podem estar relacionados com outras espécies de

bactérias lácticas presentes no ambiente de fabricação, que contaminaram o produto.



**Figura 2** - Viabilidade média das BAL nas amostras de bebidas lácteas dos laticínios A e B, durante a estocagem refrigerada.

Diversos fatores afetam a viabilidade das BAL nos produtos, assim como a cinética da acidificação do meio, tais como: o teor de sólidos do leite, a presença de conservantes e de outros micro-organismos, a disponibilidade de nutrientes, a concentração de açúcares, a concentração do inóculo, a temperatura de incubação, o valor de pH, os teores de ácidos e de peróxido de hidrogênio produzidos pelas BAL, a temperatura durante a estocagem, a concentração de oxigênio contida no produto e a permeabilidade do oxigênio por meio da embalagem (OLIVEIRA et al., 2001; LOURENS-HATTING; VILJOEN et al., 2001; OLIVEIRA; DAMIN, 2003; GUEIMONDE et al., 2004; MORTAZAVIAN et al., 2007).

A redução da viabilidade durante a estocagem refrigerada também foi relatada por Krüger e colaboradores (2008) ao desenvolverem uma bebida láctea fermentada por cultura mista (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*). Apesar da redução populacional das BAL, com  $2,5 \times 10^7$  UFC/mL no produto recém processado, estas permaneceram viáveis até os 22 dias de estocagem, com  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Lima e colaboradores (2009) e Tebaldi e colaboradores (2007) avaliaram a viabilidade láctea de bebidas lácteas fermentadas comercializadas em

Recife, PE e no sul de Minas Gerais, respectivamente. Lima e colaboradores (2009) relataram que apenas seis amostras (33,0 %), se mostraram em acordo com os padrões exigidos para a viabilidade de BAL. Tebaldi e colaboradores (2007) constataram que apenas uma das vinte amostras avaliadas (5,0 %), atendeu aos padrões recomendados.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (BRASIL, 2005) recomenda uma temperatura não superior a 10°C para a conservação e comercialização de bebidas lácteas fermentadas. Tal condição auxilia na manutenção da viabilidade das BAL no produto, uma vez que proporciona uma maior extensão na fase estacionária desses micro-organismos, pois é a sua viabilidade que determinará o período de vida útil do produto.

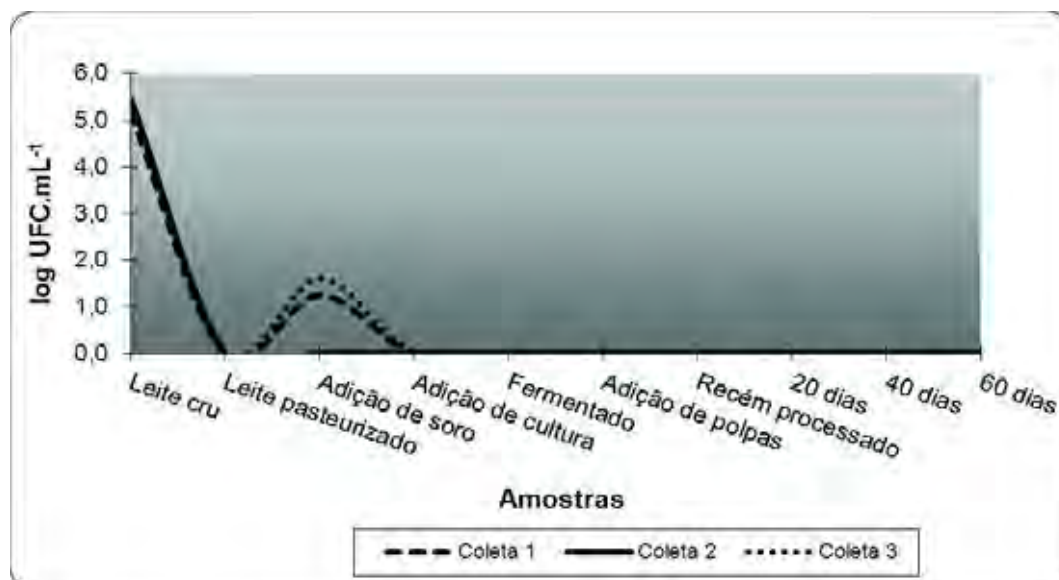
### **3.2.2 - Enumeração de fungos leveduriformes**

As populações médias de fungos leveduriformes das amostras de leite cru, provenientes das três coletas no laticínio A, apresentaram variação de 5,17 a 5,46 log UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 3).

No laticínio A, após a recepção, o leite cru foi submetido ao processo de pasteurização, promovendo a injúria dos micro-organismos contaminantes. A eficácia dessa etapa foi comprovada pela redução da população microbiana nas amostras de leite pasteurizado. Após a pasteurização houve baixa incidência dos contaminantes, quando comparada à contaminação inicial. Apesar de o tratamento térmico inibi-los, sua presença foi confirmada na etapa subsequente, a da adição de soro, açúcar e estabilizante.

O laticínio A emprega o soro de leite em pó, no qual são analisados somente os parâmetros físico-químicos e de estabilidade térmica. O soro gerado pelo laticínio, devido à produção de queijos, é vendido para produção de ração animal. As polpas de frutas comerciais pasteurizadas, assim como os demais ingredientes utilizados (exceto o soro de leite), são submetidos a um controle físico-químico e microbiológico em todos os lotes. Possivelmente houve recontaminação por algum dos ingredientes adicionado, ou mais provável, pelo manipulador, durante o preparo da bebida láctea. A Figura 5 ilustra a redução populacional dos fungos leveduriformes durante o processo

de fabricação e nos diferentes tempos de estocagem da bebida láctea fermentada.



**Figura 3** - Variações populacionais de fungos leveduriformes nas amostras coletadas no laticínio A.

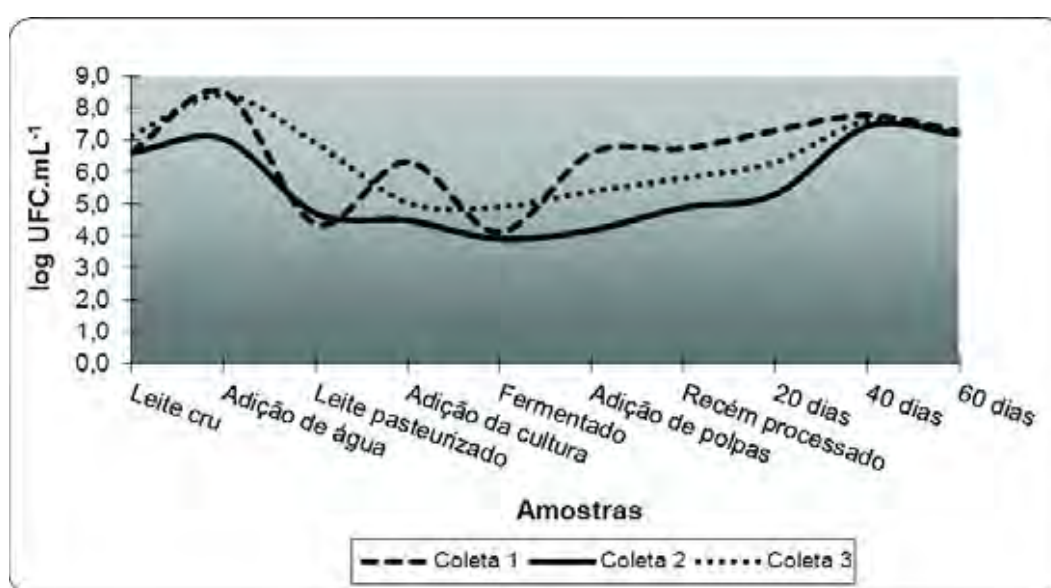
Após a adição da cultura láctica, não foi detectada a presença de fungos leveduriformes em todas as amostras. A ausência de fungos no produto está relacionada a uma aplicação adequada das BPF, desde a obtenção da matéria-prima até o produto acabado, das condições de transporte até os pontos de comercialização e armazenamento adequados, a fim de oferecer ao consumidor um produto íntegro e idôneo.

Além das BPF, a presença das BAL pode influenciar a existência e a permanência dos contaminantes, pois, alteram as condições do leite, impedindo o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos indesejáveis. Essas condições incluem baixos valores de pH (4,6 a 4,0), baixo potencial redox, produção de ácidos (preferencialmente o ácido láctico) e outros metabólitos, como peróxido e oxigênio com atividade antagonista (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As amostras do laticínio A apresentaram baixos índices iniciais de contaminação, por fungos leveduriformes, resultando na ausência desses micro-organismos até o último período de estocagem avaliado. Apesar das bebidas lácteas comportarem-se como ótimos meios de cultivo para os fungos,

estes só serão capazes de se desenvolver quando a biota contaminante é elevada (Hoffmann, (2001). Portanto, embora constatados alguns focos de contaminação, o produto do laticínio A, foi considerado de boa qualidade microbiológica, sendo confirmada a viabilidade das BAL e ausente de contaminação por fungos, até os 60 dias de estocagem avaliados, como preconiza a legislação.

O mesmo cenário não foi observado nas amostras do laticínio B. A Figura 4 ilustra as variações populações dos fungos leveduriformes; desde as amostras do leite cru até a bebida láctea com 60 dias de estocagem.



**Figura 4** - Variações populacionais de fungos leveduriformes nas amostras coletadas no laticínio B.

As amostras de leite cru, em todas as coletas, apresentaram elevada população de fungos leveduriformes, variando entre 6,63 e 7,15 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

O monitoramento irregular da saúde, especialmente do úbere do animal, a utilização da água para a limpeza do local da ordenha e do animal, sem prévio diagnóstico de sua qualidade, higienização e sanitização inadequadas dos tetos, bem como dos equipamentos utilizados durante a ordenha, e principalmente, condições inadequadas durante o transporte do leite cru, contribuíram potencialmente para o aumento da microbiota contaminante.

Toda medida para a redução da contaminação no leite pelo homem, equipamentos e ambiente, deve ser tomada desde o momento da ordenha até a chegada a indústria de laticínios e ao consumidor (VELLOSO, 2002). Por

isso, Miranda (2007) ressalta que a qualidade dos produtos derivados do leite dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima.

De acordo com o fluxograma de processamento do laticínio B, após a recepção do leite, é efetuada a adição de água, açúcar e estabilizante. Como o laticínio B utilizou água proveniente de um poço, não havendo qualquer controle da qualidade da água utilizada, esta pode ser uma fonte de contaminação em potencial. De acordo com a Figura 5, nota-se um aumento na população de fungos leveduriformes, de 7,04 a 8,51 log UFC.mL<sup>-1</sup>, possivelmente devido à adição da água ou outro ingrediente contaminado. Não é efetuado controle microbiológico desses ingredientes, assim como o laticínio B não atende os critérios recomendados para a seleção das matérias-primas baseados na segurança dos alimentos, tampouco possui o manual de BPF. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida láctea (BRASIL, 2005), o produto fabricado pelo laticínio B não pode ser considerado uma bebida láctea fermentada, uma vez que, a mesma é definida como o produto resultante da fermentação de leite e soro de leite e não leite e água, como procede no laticínio.

Apesar de o processo de pasteurização ter promovido uma redução dos contaminantes, 4,38 a 6,91 log UFC.mL<sup>-1</sup>, tais valores são considerados inadequados sob o ponto de vista higiênico-sanitário, uma vez que o tratamento térmico aplicado tem como função eliminar os micro-organismos patogênicos e deteriorantes. De acordo com os dados obtidos, tal procedimento não se fez adequado ou efetivo, devido à permanência daqueles indesejáveis.

Porém, após a fermentação observou-se uma redução na população dos fungos, 3,90 a 4,91 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Possivelmente, houve uma competição inicial por nutrientes entre as bactérias e os fungos, uma vez que as bactérias se desenvolvem mais rapidamente, portanto, maior população de bactérias em detrimento dos fungos. Porém as BAL fermentam a lactose produzindo ácido láctico, promovendo a acidificação da bebida láctea, proporcionando um ambiente adequado para a permanência e o posterior desenvolvimento dos fungos leveduriformes.

Com a adição das polpas de frutas, as contagens aumentaram novamente, 4,18 a 6,60 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Assim como em todos os outros

ingredientes, não eram realizados controles físico-químicos e microbiológicos nas polpas de fruta. Portanto, a recontaminação pode ser proveniente da polpa adicionada ou ainda do manipulador. As amostras das bebidas lácteas recém processadas, com 20, 40 e 60 dias de estocagem, apresentaram um aumento gradativo na população dos fungos.

De forma resumida, a contaminação por fungos leveduriformes pode ocorrer por conduta inadequada do manipulador, durante o manejo da ordenha, ou ainda pela falta de higiene do mesmo; do próprio animal, quando este apresenta a saúde comprometida por mastite micótica; o mau funcionamento do sistema de ordenha; limpeza inadequada das instalações e dos equipamentos; ausência das BPF durante as etapas de processamento, transporte e armazenamento (RUZ-PEREZ et al., 2004; YAMAMURA et al., 2007).

As elevadas concentrações celulares das BAL, encontradas nas amostras do laticínio B, resultaram em uma maior produção de ácido láctico, o que poderia comprometer não só a qualidade físico-química e sensorial do produto, como também a microbiológica, proporcionando um ambiente adequado para o desenvolvimento de fungos leveduriformes. Esses micro-organismos, devido às suas características fisiológicas, apresentam ótimo desenvolvimento sob condições ácidas ( $\text{pH} < 4,0$ ), o que explica, juntamente com as condições inadequadas desde a obtenção da matéria-prima até a do produto acabado, elevadas populações desses micro-organismos.

Apesar a ausência de um padrão legal para a enumeração de fungos filamentosos e leveduriformes em bebidas lácteas as elevadas populações observadas podem promover deterioração e comprometer a vida útil do produto, tornando-o inadequado para o consumo.

A relação entre a adequação das BPF e a qualidade de bebidas lácteas obtida experimentalmente reforça que para garantir a qualidade do produto, medidas de prevenção, higiene e controle, por meio da implantação de programas de qualidade como as BPF, 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.

### 3.3 - Caracterização físico-química das amostras coletadas no laticínio B

Para a avaliação dos resultados, empregou-se o Teste t para amostras emparelhadas, considerando a variabilidade significativa ( $p > 0,05$ ) inerente ao processo. Pelos valores de P encontrados, não houveram diferenças estatisticamente significativas no teor de sólidos totais entre as amostras de todas as coletas (Tabela 3). Apesar da adição de água, ao invés do soro de leite, como ocorre habitualmente neste laticínio, os teores de sólidos totais obtidos foram considerados normais.

Os valores de pH das amostras das coletas relacionaram-se inversamente aos de acidez obtidos, ou seja, houve redução dos valores de pH e conseqüente aumento da acidez ao longo do tempo (Tabela 3).

Houve diferenças estatisticamente significativas na acidez titulável entre as diferentes coletas e nos diferentes tempos de estocagem.

**Tabela 3** - Características físico-químicas\* das amostras de bebidas lácteas do Laticínio B, durante a estocagem.

| Variáveis                    | Período de estocagem (dias) | Coleta 1   | Coleta 2   | Coleta 3   |
|------------------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|
| <b>Sólidos totais (%)</b>    | 1                           | 12,52±0,11 | 12,79±0,10 | 12,98±0,10 |
| <b>pH</b>                    | 1                           | 4,25±0,11  | 4,02±0,11  | 3,91±0,11  |
|                              | 20                          | 3,93±0,11  | 3,95±0,11  | 3,85±0,11  |
|                              | 40                          | 3,60±0,11  | 3,84±0,11  | 3,57±0,11  |
|                              | 60                          | 3,00±0,11  | 3,71±0,11  | 3,43±0,11  |
|                              | 60                          | 3,00±0,11  | 3,71±0,11  | 3,43±0,11  |
| <b>Acidez titulável (°D)</b> | 1                           | 57,14±0,11 | 63,76±0,11 | 61,97±0,11 |
|                              | 20                          | 59,49±0,11 | 72,80±0,11 | 75,73±0,11 |
|                              | 40                          | 63,10±0,11 | 73,54±0,10 | 77,39±0,10 |
|                              | 60                          | 78,87±0,11 | 75,46±0,11 | 79,90±0,11 |

\* - média de três repetições -  $\bar{x} \pm s$

Os elevados índices de contaminação podem ter contribuído para o aumento da acidez titulável, uma vez que, populações de fungos, assim como de BAL utilizam a lactose, como substrato para seu desenvolvimento, obtendo o ácido lático como metabólito.

Esta pós-acidificação em produtos lácteos fermentados também foi relatada por outros autores. Oliveira (2006) explica que as variáveis como a diminuição do pH e o aumento da acidez são conseqüências da cultura iniciadora utilizada, do tempo e da temperatura de estocagem e do metabolismo residual dos micro-organismos, assim como as técnicas empregadas durante o processamento para a produção, acondicionamento e estocagem do fermentado. Jacques e Casaregola (2008) explicam que as características físico-químicas dos produtos lácteos, favorecem o desenvolvimento dos fungos, assim como a capacidade de fermentação e assimilação de lactose ou galactose, a atividade proteolítica e lipolítica, a utilização do ácido lático e a habilidade de desenvolvimento em baixas temperaturas, apresentadas por esses micro-organismos.

#### 4 - Conclusão

É possível observar uma relação direta entre a adequação de BPF e a qualidade de bebidas lácteas fermentadas.

No Laticínio A, o atendimento de 96,95 % dos itens de BPF resultou em produtos com boa qualidade microbiológica, elevada viabilidade de BAL e ausência de fungos leveduriformes até os 60 dias de estocagem.

Devido às condições estruturais e sanitárias deficientes em toda a linha de processamento, o Laticínio B atendeu apenas 49,39 % dos itens de BPF, além de utilizar leite excessivamente contaminado para o preparo das bebidas lácteas. Estas condições comprometeram a qualidade do produto final, que apresentou elevados índices populacionais de fungos leveduriformes.

#### 5 - Referências bibliográficas

BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº. 16 de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento técnico de

identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 24 ago. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC n. 275 de 21 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 21 out. 2002.

CASE, R. A.; BRADLEY, J. R. R. L.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15. ed. Washington, 1985. p. 327-404.

COSTA, G. M. P. et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1938-1942, 2008.

DAHMER, A. M. **Avaliação da gestão da qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**. 2006. 218 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Agronegócios, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

GUEIMONDE, M. et al. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, Barking, v. 37, n. 9, p. 839-850, 2004.

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, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

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.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. Yogurt enumeration of characteristic microorganisms. **International IDF Standard**, Brussels, n. 41, p. 1-4, 1997.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

KAVAS, G. et al. Characterization of yeasts isolated from artisanal Turkish dairy products. **International Journal of Dairy Science**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2006.

KRÜGER, R. et al. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 43-53, 2008.

LIMA, R. M. T. et al. Análise microbiológica e físico-química de bebidas lácteas comercializadas no Recife, PE. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX 2009), 2009, Recife. **Anais... Tecnologia Rural**, 2009.

LOPANDIC, K. et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-3, p. 341-350, 2006.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

MADRONA, G. S.; PIOLA, M. M.; TERRA, C. O. Qualidade em laticínios: análise do conhecimento de colaboradores de um pequeno laticínio sobre o assunto. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 477-486, 2009.

MIRANDA, Z. B. **Microbiota: pescado, leite, mel e carne bovina**. Curso de Pós-Graduação em Higiene veterinária e processamento tecnológico de produtos de origem animal. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2007.

MORTAZAVIAN, A. M. et al. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 60, n. 2, p. 123-127, 2007.

NADA, S. et al. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 728-731, 2012.

OLIVEIRA, M. N. et al. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 11-12, p. 935-942, 2001.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, supl. 0, p. 172-176, 2003.

OLIVEIRA, V. M. **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, bacteriológicas e sensoriais**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

PUGA, L. C. H. P. **Serviço de inspeção estadual de produtos de origem animal: uma visão pela coordenadoria regional de Juiz de Fora, MG**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

REIS, J. A. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em bebidas lácteas fermentadas, adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

RUZ-PEREZ, M. et al. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 663-665, 2004.

TEBALDI, V. M. R. et al. Avaliação microbiológica de bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do Sul de Minas Gerais. **Ciências Agrárias**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1085-1088, 2007.

TORKAR, K. G.; VENGUST, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 1, p. 570-577, 2008.

VALLIN, V. N. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009.

VELLOSO, C. R. V. **Elementos de Inspeção Sanitária e Tecnológica de Leite e Produtos Lácteos**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2002. 46 p.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2 ed. New York: CRC Press, 2006. 782p.

YAMAMURA, A. A. M. et al. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente de animais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 105-114, 2007.

## Anexo A

**Quadro 1.** Lista de verificação para diagnóstico dos estabelecimentos produtores de bebidas lácteas (BRASIL, 2002).

| IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA:                                                                                                                                                                                                                       |     |     |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-------|
|                                                                                                                                                                                                                                                 |     |     |       |
| AVALIAÇÃO                                                                                                                                                                                                                                       | SIM | NÃO | NA(*) |
| <b>1. EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES</b>                                                                                                                                                                                                              |     |     |       |
| <b>1.1. ÁREA EXTERNA:</b>                                                                                                                                                                                                                       |     |     |       |
| 1.1.1. Área externa livre de focos de insalubridade, de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente, de vetores e outros animais no pátio e vizinhança; de focos de poeira; de acúmulo de lixo nas imediações, de água estagnada, dentre outros. |     |     |       |
| 1.1.2. Vias de acesso interno com superfície dura ou pavimentada, adequada ao trânsito sobre rodas, escoamento e limpas.                                                                                                                        |     |     |       |
| <b>1.2. ACESSO</b>                                                                                                                                                                                                                              |     |     |       |
| 1.2.1. Direto, não comum a outros usos (habitação)                                                                                                                                                                                              |     |     |       |
| <b>1.3. ÁREA INTERNA</b>                                                                                                                                                                                                                        |     |     |       |
| 1.3.1. Área interna livre de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente.                                                                                                                                                                        |     |     |       |
| <b>1.4. PISO</b>                                                                                                                                                                                                                                |     |     |       |
| 1.4.1. Material que permite fácil e apropriada higienização (liso, resistente, drenados com declive, impermeável e outros).                                                                                                                     |     |     |       |
| 1.4.2. Em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).                                                                                                                                            |     |     |       |
| 1.4.3. Sistema de drenagem dimensionado adequadamente, sem acúmulo de resíduos. Drenos, ralos sifonados e grelhas colocados em locais adequados de forma a facilitar o escoamento e proteger contra a entrada de baratas, roedores, etc.        |     |     |       |
| <b>1.5. TETOS</b>                                                                                                                                                                                                                               |     |     |       |
| 1.5.1. Acabamento liso, em cor clara, impermeável, de fácil limpeza e, quando for o caso, desinfecção.                                                                                                                                          |     |     |       |
| 1.5.2. Em adequado estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, umidade, bolor, descascamento e outros).                                                                                                                                |     |     |       |
| <b>1.6. PAREDES E DIVISÓRIAS</b>                                                                                                                                                                                                                |     |     |       |
| 1.6.1. Acabamento liso, impermeável, de fácil higienização até uma altura adequada para todas as operações.                                                                                                                                     |     |     |       |
| 1.6.2. Em adequado estado de conservação (livre de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).                                                                                                                                        |     |     |       |
| 1.6.3. Existência de ângulos abaulados entre as paredes e o piso e entre as paredes e o teto.                                                                                                                                                   |     |     |       |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| <b>1.7. PAREDES</b>                                                                                                                                                                                                                                                             |            |            |              |
| 1.7.1. Com superfície lisa, de fácil higienização, ajustadas aos batentes, sem falhas de revestimento.                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.7.2. Portas externas com fechamento automático (mola, sistema elétrico e outro) e com barreiras adequadas para impedir entrada de vetores e outros animais (telas milimétricas ou outro sistema).                                                                             |            |            |              |
| 1.7.3. Em adequado estado de conservação (livre de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).                                                                                                                                                                        |            |            |              |
| <b>1.8. JANELAS E OUTRAS ABERTURAS</b>                                                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.8.1. Com superfície lisa, de fácil higienização, ajustadas aos batentes, sem falhas de revestimento.                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.8.2. Existência de proteção de insetos e roedores (telas milimétricas ou outro sistema).                                                                                                                                                                                      |            |            |              |
| 1.8.3. Em adequado estado de conservação (livre de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).                                                                                                                                                                        |            |            |              |
| <b>1.9. ESCADAS, ELEVADORES DE SERVIÇO, MONTACARGAS E ESTRUTURAS AUXILIARES</b>                                                                                                                                                                                                 |            |            |              |
| 1.9.1. Construídos, localizados e utilizados de forma a não serem fontes de contaminação.                                                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 1.9.2. De material apropriado, resistente, liso e impermeável, em adequado estado de conservação.                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| <b>1.10. INSTALAÇÕES SANITÁRIAS E VESTIÁRIOS PARA OS MANIPULADORES</b>                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.10.1. Localizados isolados da área de produção, acesso realizado por passagens cobertas e calçadas.                                                                                                                                                                           |            |            |              |
| 1.10.2. Independentes para cada sexo (conforme legislação específica), identificados e de uso exclusivo para manipuladores de alimentos.                                                                                                                                        |            |            |              |
| 1.10.3. Instalações sanitárias com vasos sanitários e lavatórios íntegros e em proporção adequada ao número de empregados (conforme legislação específica).                                                                                                                     |            |            |              |
| 1.10.4. Instalações sanitárias servidas de água corrente, dotadas preferencialmente de torneira com acionamento automático e conectadas à rede de esgoto ou fossa séptica.                                                                                                      |            |            |              |
| 1.10.5. Ausência de comunicação direta (incluindo sistema de exaustão) com a área de trabalho de refeições.                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 1.10.6. Portas com fechamento automático (molas, sistema eletrônico ou outros).                                                                                                                                                                                                 |            |            |              |
| 1.10.7. Pisos e paredes adequadas e apresentando satisfatório estado de conservação                                                                                                                                                                                             |            |            |              |
| 1.10.8. Iluminação e ventilação adequadas.                                                                                                                                                                                                                                      |            |            |              |
| 1.10.9. Instalações sanitárias dotadas de produtos destinados à higiene pessoal: papel higiênico, sabonete líquido inodoro anti-séptico, sabonete líquido inodoro e anti-séptico, toalhas de papel não reciclado para as mãos ou outro sistema higiênico e seguro para secagem. |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 1.10.10. Presença de lixeiras com tampas e com acionamento não manual.                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.10.11. Coleta freqüente de lixo.                                                                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 1.10.12. Presença de avisos com procedimentos para lavagem das mãos.                                                                                                                                                                                                            |            |            |              |
| 1.10.13. Vestiários com área compatível e armários individuais para todos os manipuladores.                                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 1.10.14. Duchas ou chuveiros em número suficiente (conforme legislação específica), com água fria ou com água quente e fria.                                                                                                                                                    |            |            |              |
| 1.10.15. Apresentam-se organizados e em adequado estado de conservação.                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| <b>1.11. INSTALAÇÕES SANITÁRIAS PARA VISITANTES E OUTROS</b>                                                                                                                                                                                                                    |            |            |              |
| 1.11.1. Instaladas totalmente independentes da área de produção e higienizados.                                                                                                                                                                                                 |            |            |              |
| <b>1.12. LAVATÓRIOS NA ÁREA DE PRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 1.12.1. Existência de lavatórios na área de manipulação com água corrente, dotados preferencialmente de torneira com acionamento automático, em posições adequadas em relação ao fluxo de produção e serviço, e em número suficiente de modo a atender toda a área de produção. |            |            |              |
| 1.12.2. Lavatórios em condições de higiene, dotados de sabonete líquido inodoro anti-séptico, sabonete líquido inodoro e anti-séptico, toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro para secagem e coletor de papel acionados sem contato manual.         |            |            |              |
| <b>1.13. ILUMINAÇÃO E INSTALAÇÃO ELÉTRICA</b>                                                                                                                                                                                                                                   |            |            |              |
| 1.13.1. Natural ou artificial adequada à atividade desenvolvida, sem ofuscamento, reflexos fortes, sombras e contrastes excessivos.                                                                                                                                             |            |            |              |
| 1.13.2. Luminárias com proteção adequada contra quebras e em adequado estado de conservação.                                                                                                                                                                                    |            |            |              |
| 1.13.3. Instalações elétricas embutidas ou quando exteriores revestidas por tubulações isolantes e presas a paredes e tetos.                                                                                                                                                    |            |            |              |
| <b>1.14. VENTILAÇÃO E CLIMATIZAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.14.1. Ventilação e circulação de ar capazes de garantir o conforto térmico e o ambiente livre de fungos, gases, fumaça, pós, partículas em suspensão e condensação de vapores sem causar danos à saúde.                                                                       |            |            |              |
| 1.14.2. Ventilação artificial por meio de equipamento(s) higienizado(s) e com manutenção adequada ao tipo de equipamento.                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 1.14.3. Ambientes climatizados artificialmente com filtros adequados.                                                                                                                                                                                                           |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                     | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 1.14.4. Existência de registro periódico dos procedimentos de limpeza e manutenção dos componentes do sistema de climatização (conforme legislação específica) afixado em local visível.                             |            |            |              |
| 1.14.5. Sistema de exaustão e ou insuflamento com troca de ar capaz de prevenir contaminações.                                                                                                                       |            |            |              |
| 1.14.6. Sistema de exaustão e ou insuflamento dotados de filtros adequados.                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.14.7. Captação e direção da corrente de ar não seguem a direção da área contaminada para área limpa.                                                                                                               |            |            |              |
| <b>1.15. HIGIENIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES</b>                                                                                                                                                                            |            |            |              |
| 1.15.1. Existência de um responsável pela operação de higienização comprovadamente capacitado.                                                                                                                       |            |            |              |
| 1.15.2. Frequência de higienização das instalações adequada.                                                                                                                                                         |            |            |              |
| 1.15.3. Existência de um registro da higienização.                                                                                                                                                                   |            |            |              |
| 1.15.4. Produtos de higienização pelo Ministério da Saúde.                                                                                                                                                           |            |            |              |
| 1.15.5. Disponibilidade dos produtos de higienização necessários à realização da operação.                                                                                                                           |            |            |              |
| 1.15.6. A diluição dos produtos de higienização, tempo de contato e modo de uso/aplicação obedecem às instruções recomendadas pelo fabricante.                                                                       |            |            |              |
| 1.15.7. Produtos de higienização identificados e guardados em local adequado.                                                                                                                                        |            |            |              |
| 1.15.8. Disponibilidade e adequação dos utensílios (escovas, esponjas, etc.) necessários à realização da operação. Em bom estado de conservação.                                                                     |            |            |              |
| 1.15.9. Higienização adequada                                                                                                                                                                                        |            |            |              |
| <b>1.16. CONTROLE INTEGRADO DE VETORES E PRAGAS URBANAS</b>                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.16.1. Ausência de vetores e pragas urbanas ou evidência de sua presença como fezes, ninhos e outros.                                                                                                               |            |            |              |
| 1.16.2. Adoção de medidas preventivas e corretivas com o objetivo de impedir a atração, o abrigo, o acesso e ou proliferação de vetores e pragas urbanas.                                                            |            |            |              |
| 1.16.3. Em caso de adoção de controle químico, existência de comprovante de execução do serviço expedido por empresa especializada.                                                                                  |            |            |              |
| <b>1.17. ABASTECIMENTO DE ÁGUA</b>                                                                                                                                                                                   |            |            |              |
| 1.17.1. Sistema de abastecimento                                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 1.17.2. Sistema de captação própria, protegido, revestido e distante de fonte de contaminação.                                                                                                                       |            |            |              |
| 1.17.3. Reservatório de água acessível com instalação hidráulica com volume, pressão e temperatura adequados, dotado de tampas, em satisfatória condição de uso, livre de vazamentos, infiltrações e descascamentos. |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 1.17.4. Existência de responsável comprovadamente capacitado para a higienização do reservatório da água.                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 1.17.5. Apropriada frequência de higienização do reservatório de água.                                                                                                                                                                                                        |            |            |              |
| 1.17.6. Existência de registro da higienização do reservatório de água ou comprovante de execução de serviço em caso de terceirização.                                                                                                                                        |            |            |              |
| 1.17.7. Encanamento em estado satisfatório e ausência de infiltrações e interconexões, evitando conexão cruzada entre água potável e não potável.                                                                                                                             |            |            |              |
| 1.17.8. Existência de planilha de registro da troca periódica do elemento filtrante.                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.17.9. Potabilidade da água atestada por meio de laudos laboratoriais, com adequada periodicidade, assinados por técnico responsável pela análise ou expendidos por empresa terceirizada.                                                                                    |            |            |              |
| 1.17.10. Disponibilidade de reagentes e equipamentos necessários à análise da potabilidade de água realizadas no estabelecimento.                                                                                                                                             |            |            |              |
| 1.17.11. Controle de potabilidade realizado por técnico comprovadamente capacitado.                                                                                                                                                                                           |            |            |              |
| 1.17.12. Gelo produzido com água potável, fabricado, manipulado e estocado sob condições sanitárias satisfatórias, quando destinado (ou superfície) a entrar em contato com alimento.                                                                                         |            |            |              |
| 1.17.13. Vapor gerado a partir de água potável quando utilizado em contato com o alimento ou superfície que entre em contato com o alimento.                                                                                                                                  |            |            |              |
| <b>1.18. MANEJO DE RESÍDUOS</b>                                                                                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| 1.18.1. Recipientes para coleta de resíduos no interior do estabelecimento de fácil higienização e transporte, devidamente identificados e higienizados constantemente; uso de sacos de lixo apropriados. Quando necessário, recipientes tampados com acionamento não manual. |            |            |              |
| 1.18.2. Retirada freqüente dos resíduos da área de processamento, evitando focos de contaminação.                                                                                                                                                                             |            |            |              |
| 1.18.3. Existência de área adequada para estocagem dos resíduos.                                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| <b>1.19. ESGOTAMENTO SANITÁRIO</b>                                                                                                                                                                                                                                            |            |            |              |
| 1.19.1. Fossas, esgoto conectado à rede pública, caixas de gordura em adequado estado de conservação e funcionamento.                                                                                                                                                         |            |            |              |
| <b>1.20. LEIAUTE</b>                                                                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 1.20.1. Leiaute adequado ao processo produtivo: número, capacidade e distribuição das dependências de acordo com o ramo de atividade, volume de produção e expedição.                                                                                                         |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                       | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 1.20.2. Áreas para recepção e depósito de matéria-prima, ingredientes e embalagens distintas das áreas de produção, armazenamento e expedição de produto final.                                                                                        |            |            |              |
| <b>2. EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS</b>                                                                                                                                                                                                            |            |            |              |
| <b>2.1. EQUIPAMENTOS</b>                                                                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| 2.1.1. Equipamentos da linha de produção com desenho e número adequado ao ramo.                                                                                                                                                                        |            |            |              |
| 2.1.2. Dispostos de forma a permitir fácil acesso e higienização adequada.                                                                                                                                                                             |            |            |              |
| 2.1.3. Superfícies em contato com alimentos lisas, íntegras, impermeáveis, resistentes à corrosão, de fácil higienização e de material não contaminante.                                                                                               |            |            |              |
| 2.1.4. Em adequado estado de conservação e funcionamento.                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 2.1.5. Equipamento de conservação dos alimentos (refrigeradores, congeladores, câmaras frigoríficas e outros), bem como os destinados ao processamento térmico, com medidor de temperatura localizado em local apropriado e em adequado funcionamento. |            |            |              |
| 2.1.6. Existência de planilhas de registro de temperatura, conservadas durante período adequado.                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 2.1.7. Existência de registros que comprovem que os equipamentos e maquinários passam por manutenção preventiva.                                                                                                                                       |            |            |              |
| 2.1.8. Existência de registros que comprovem a calibração dos instrumentos e equipamentos de medição ou comprovante de execução do serviço quando a calibração for realizada por empresas terceirizadas.                                               |            |            |              |
| <b>2.2. MÓVEIS (MESAS, BANCADAS, VITRINES, ESTANTES)</b>                                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| 2.2.1. Em número suficiente, de material apropriado, resistentes, impermeáveis, em adequado estado de conservação, com superfícies íntegras.                                                                                                           |            |            |              |
| 2.2.2. Com desenho que permita uma fácil higienização (lisos, sem rugosidade e frestas).                                                                                                                                                               |            |            |              |
| <b>2.3. UTENSÍLIOS</b>                                                                                                                                                                                                                                 |            |            |              |
| 2.3.1. Material não contaminante, resistentes à corrosão, de tamanho e forma que permitam fácil higienização: em adequado estado de conservação e em número suficiente e apropriado ao tipo de operação utilizada.                                     |            |            |              |
| 2.3.2. Armazenados em local apropriado, de forma organizada e protegidos contra a contaminação.                                                                                                                                                        |            |            |              |
| <b>2.4. HIGIENIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E MAQUINÁRIOS, E DOS MÓVEIS E UTENSÍLIOS</b>                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 2.4.1. Existência de um responsável pela operação de higienização comprovadamente capacitado.                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 2.4.2. Frequência da higienização adequada.                                                                                                                                                                                                            |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                      | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 2.4.3. Existência de registro da higienização.                                                                                                                                                        |            |            |              |
| 2.4.4. Produtos de higienização regularizados pelo Ministério da Saúde.                                                                                                                               |            |            |              |
| 2.4.5. Disponibilidade dos produtos de higienização necessários à realização da operação.                                                                                                             |            |            |              |
| 2.4.6. Diluição dos produtos de higienização, contato e aplicação obedecem às instruções do fabricante.                                                                                               |            |            |              |
| 2.4.7. Produtos de higienização identificados e guardados em local adequado.                                                                                                                          |            |            |              |
| 2.4.8. Disponibilidade e adequação dos utensílios necessários à realização da operação. Em bom estado de conservação.                                                                                 |            |            |              |
| 2.4.9. Adequada higienização.                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| <b>3. MANIPULADORES</b>                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| <b>3.1. VESTUÁRIO</b>                                                                                                                                                                                 |            |            |              |
| 3.1.1. Utilização de uniforme de trabalho de cor clara, adequado à atividade e exclusivo para área de produção                                                                                        |            |            |              |
| 3.1.2. Limpos e em adequado estado de conservação.                                                                                                                                                    |            |            |              |
| 3.1.3. Asseio pessoal: boa apresentação, asseio corporal mãos limpas, unhas cortadas, sem esmalte, sem adornos (anéis, pulseiras, brincos, etc.); manipuladores barbeados, com os cabelos protegidos. |            |            |              |
| <b>3.2. HÁBITOS HIGIÊNICOS</b>                                                                                                                                                                        |            |            |              |
| 3.2.1. Lavagem cuidadosa das mãos antes da manipulação de alimentos, principalmente após qualquer interrupção e depois do uso de sanitários.                                                          |            |            |              |
| 3.2.2. Manipuladores não espirram sobre alimentos, não cospem, não tosem, não fumam, não manipulam dinheiro ou não praticam outros atos que possam contaminar o alimento.                             |            |            |              |
| 3.2.3. Cartazes de orientação aos manipuladores sobre a correta lavagem das mãos e demais hábitos de higiene, afixados em locais apropriados.                                                         |            |            |              |
| <b>3.3. ESTADO DE SAÚDE</b>                                                                                                                                                                           |            |            |              |
| 3.3.1. Ausência de afecções cutâneas, feridas e supurações; ausência de sintomas e infecções respiratórias, gastrointestinais e oculares.                                                             |            |            |              |
| <b>3.4. PROGRAMA DE CONTROLE DE SAÚDE</b>                                                                                                                                                             |            |            |              |
| 3.4.1. Existência de supervisão periódica do estado de saúde dos manipuladores.                                                                                                                       |            |            |              |
| 3.4.2. Existência de registro dos exames realizados.                                                                                                                                                  |            |            |              |
| <b>3.5. EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL</b>                                                                                                                                                        |            |            |              |
| 3.5.1. Utilização de equipamento de proteção individual                                                                                                                                               |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| <b>3.6. PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO DOS MANIPULADORES E SUPERVISÃO</b>                                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| 3.6.1. Existência de programa de capacitação adequado e contínuo relacionado à higiene pessoal e à manipulação dos alimentos.                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 3.6.2. Existência de registro dessas capacitações.                                                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| 3.6.3. Existência de supervisão da higiene pessoal e manipulação dos alimentos.                                                                                                                                                                                                            |            |            |              |
| 3.6.4. Existência de supervisor comprovadamente capacitado.                                                                                                                                                                                                                                |            |            |              |
| <b>4. PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO</b>                                                                                                                                                                                                                                                |            |            |              |
| <b>4.1. MATÉRIA-PRIMA, INGREDIENTES E EMBALAGENS</b>                                                                                                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 4.1.1. Operações de recepção da matéria-prima, ingredientes e embalagens são realizadas em local protegido da área de processamento.                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 4.1.2. Matérias-primas, ingredientes e embalagens inspecionadas na recepção.                                                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| 4.1.3. Existência de planilhas de controle na recepção (temperatura e características sensoriais, condições de transporte e outros).                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 4.1.4. Matérias-primas e ingredientes aguardando liberação e aqueles aprovados, devidamente identificados.                                                                                                                                                                                 |            |            |              |
| 4.1.5. Matérias-primas, ingredientes e embalagens reprovadas no controle efetuado na recepção são devolvidos imediatamente ou identificados e armazenados em local separado.                                                                                                               |            |            |              |
| 4.1.6. Rótulos da matéria-prima e ingredientes atendem à legislação.                                                                                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 4.1.7. Critérios estabelecidos para a seleção das matérias-primas são baseados na segurança do alimento.                                                                                                                                                                                   |            |            |              |
| 4.1.8. Armazenamento em local adequado e organizado; sobre estrados distantes do piso, ou sobre paletes, bem conservados e limpos, ou sobre outro sistema aprovado, afastados das paredes e distantes do teto de forma que permita apropriada higienização, iluminação e circulação de ar. |            |            |              |
| 4.1.9. Uso de matérias-primas, ingredientes e embalagens respeita a ordem de entrada dos mesmos, sendo observado o prazo de validade.                                                                                                                                                      |            |            |              |
| 4.1.10. Acondicionamento adequado das embalagens a serem utilizadas.                                                                                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 4.1.11. Rede de frio adequada ao volume e aos diferentes tipos de matérias-primas e ingredientes.                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| <b>4.2. FLUXO DE PRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 4.2.1. Locais para pré-preparo ("área suja") isolados da área de preparo por barreira física ou técnica.                                                                                                                                                                                   |            |            |              |
| 4.2.2. Controle da circulação e acesso do pessoal.                                                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 4.2.3. Conservação adequada de materiais destinados ao reprocessamento.                                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| 4.2.4. Ordenado, linear e sem cruzamento.                                                                                                                                                                                                                                                       |            |            |              |
| <b>4.3. ROTULAGEM E ARMAZENAMENTO DO PRODUTO FINAL</b>                                                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 4.3.1. Dizeres de rotulagem com identificação visível e de acordo com a legislação vigente.                                                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 4.3.2. Produto final acondicionado em embalagens adequadas e íntegras.                                                                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| 4.3.3. Alimentos armazenados separados por tipo ou grupo, sobre estrados distantes do piso, ou sobre paletes, bem conservados e limpos, ou sobre outro sistema aprovado, afastados das paredes e distantes do teto de forma que permita apropriada higienização, iluminação e circulação de ar. |            |            |              |
| 4.3.4. Ausência de material estranho, estragado ou tóxico.                                                                                                                                                                                                                                      |            |            |              |
| 4.3.5. Armazenamento em local limpo e conservado.                                                                                                                                                                                                                                               |            |            |              |
| 4.3.6. Controle e existência de planilha de registro de temperatura, para ambientes com controle térmico.                                                                                                                                                                                       |            |            |              |
| 4.3.7. Rede de frio adequada ao volume e aos diferentes tipos de alimentos.                                                                                                                                                                                                                     |            |            |              |
| 4.3.8. Produtos avariados, com prazo de validade vencido, devolvidos ou recolhidos do mercado devidamente identificados e armazenados em local separado e de forma organizada.                                                                                                                  |            |            |              |
| 4.3.9. Produtos finais aguardando resultado analítico ou em quarentena e aqueles aprovados devidamente identificados.                                                                                                                                                                           |            |            |              |
| <b>4.4. CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO FINAL</b>                                                                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 4.4.1. Existência de controle de qualidade do produto final.                                                                                                                                                                                                                                    |            |            |              |
| 4.4.2. Existência de programa de amostragem para análise laboratorial do produto final.                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| 4.4.3. Existência de laudo laboratorial atestando o controle de qualidade do produto final, assinado pelo técnico da empresa responsável pela análise ou expedido por empresa terceirizada.                                                                                                     |            |            |              |
| 4.4.4. Existência de equipamentos e materiais necessários para análise do produto final realizadas no estabelecimento.                                                                                                                                                                          |            |            |              |
| <b>4.5. TRANSPORTE DO PRODUTO FINAL</b>                                                                                                                                                                                                                                                         |            |            |              |
| 4.5.1. Produto transportado na temperatura especificada no rótulo.                                                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 4.5.2. Veículo limpo, com cobertura para proteção de carga. Ausência de vetores e pragas urbanas ou qualquer evidência de sua presença como fezes, ninhos e outros.                                                                                                                             |            |            |              |
| 4.5.3. Transporte mantém a integridade do produto.                                                                                                                                                                                                                                              |            |            |              |
| 4.5.4. Veículo não transporta outras cargas que comprometam a segurança do produto.                                                                                                                                                                                                             |            |            |              |

(continua)

| <b>AVALIAÇÃO</b>                                                                                                                                 | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NA(*)</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------------|
| 4.5.5. Presença de equipamento para controle de temperatura quando se transporta alimentos que necessitam de condições especiais de conservação. |            |            |              |
| <b>5. DOCUMENTAÇÃO</b>                                                                                                                           |            |            |              |
| <b>5.1. MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO</b>                                                                                                |            |            |              |
| 5.1.1. Operações executadas no estabelecimentos estão de acordo com o Manual de Boas Práticas de Fabricação.                                     |            |            |              |
| <b>5.2. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRONIZADOS</b>                                                                                              |            |            |              |
| 5.2.1. Higienização das instalações, equipamentos e utensílios.                                                                                  |            |            |              |
| 5.2.1.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.1.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.2. Controle de água potável                                                                                                                  |            |            |              |
| 5.2.2.1. Existência de POP estabelecido para controle de potabilidade da água.                                                                   |            |            |              |
| 5.2.2.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.3. Higiene e saúde dos manipuladores                                                                                                         |            |            |              |
| 5.2.3.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.3.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.4. Manejo dos resíduos                                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.4.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.4.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.5. Manutenção preventiva e calibração de equipamentos.                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.5.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.5.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.6. Controle integrado de vetores e pragas urbanas.                                                                                           |            |            |              |
| 5.2.6.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.6.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.7. Seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens.                                                                                   |            |            |              |
| 5.2.7.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.7.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| 5.2.8. Programa de recolhimento de alimentos.                                                                                                    |            |            |              |
| 5.2.8.1. Existência de POP estabelecido para este item.                                                                                          |            |            |              |
| 5.2.8.2. POP descrito está sendo cumprido.                                                                                                       |            |            |              |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                                                                      |            |            |              |

### **CAPÍTULO III**

**Evolução de fungos leveduriformes isolados durante o processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas**

## RESUMO

A presença de fungos leveduriformes em bebidas lácteas fermentadas evidencia a necessidade de maior aperfeiçoamento em todas as etapas do processo de fabricação. Os objetivos deste estudo foram: isolar e identificar os micro-organismos leveduriformes das amostras coletadas, durante as etapas de fabricação das bebidas lácteas, assim como do produto recém processado, com 20, 40 e 60 dias de estocagem (a 5°C), provenientes de dois laticínios (A e B); identificar os possíveis focos de contaminação, além de avaliar a evolução das espécies identificadas durante a fabricação do produto. Das amostras coletadas do laticínio A, foram isolados *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Rhodotorula glutinis*. A partir das amostras adicionadas da cultura lática, esses micro-organismos não mais foram encontrados, pela prevalência das bactérias sobre os leveduriformes. As amostras do laticínio B apresentaram contaminantes leveduriformes até os 60 dias de estocagem. As espécies identificadas foram: *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Geotrichum candidum*. Observa-se um predomínio de cepas de *C. guilliermondii* até os 60 dias de estocagem. Este diagnóstico demonstrou as origens das contaminações de fungos leveduriformes, podendo ser utilizado para a aplicação de medidas preventivas e corretivas, a fim de reduzir a incidência de contaminantes.

**Palavras-chave:** Contaminação de alimentos, Produtos lácteos, Testes taxonômicos, *Candida* sp., *Geotrichum* sp.

## 1 - Introdução

Os consumidores estão cada vez mais exigentes, em busca de alimentos saudáveis, de procedência confiável, que proporcionem bem estar e praticidade para o seu consumo, além de apresentarem algum valor agregado e boa relação custo-benefício. Este cenário alavancou o desenvolvimento e, conseqüentemente, a popularidade das bebidas lácteas fermentadas.

Devido às suas características intrínsecas, como pH, acidez e composição nutricional, as bebidas lácteas fermentadas oferecem condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos (VILJOEN et al., 2001). Tais contaminantes são considerados indesejáveis por promoverem excessiva fermentação, utilizando a lactose como substrato, resultando em sabores estranhos àquele característico do produto, deteriorando-o, e conseqüentemente comprometendo sua vida útil.

A presença de fungos leveduriformes é indicativa de matérias-primas de má qualidade ou falhas higiênicas ao longo do processamento. Desta forma, elevadas contagens desses micro-organismos no alimento podem promover a redução de sua vida de prateleira, uma vez que, os fungos, na grande maioria dos casos, são deteriorantes (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008; JACQUES; CASAREGOLA, 2008; REIS, 2008).

Apesar da inexistência de um padrão oficial para a análise de fungos para bebidas lácteas fermentadas (BRASIL, 2001), a presença desses micro-organismos evidencia a necessidade de maior aperfeiçoamento dos cuidados na seleção das matérias-primas e durante o processo de industrialização dos alimentos, tanto quanto uma inspeção mais eficaz (PAULA, 2010).

Alguns estudos se dedicaram a investigar as principais espécies de fungos leveduriformes contaminantes em alimentos, especialmente lácteos. Costa e colaboradores (2008) identificaram 56 cepas pertencentes ao gênero *Candida* e 1 ao gênero *Trichosporum*, de amostras de leite. Silva (2003) identificou cepas de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, *Candida edax*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus* e *Saccharomyces cerevisiae* em amostras de queijos tipo Minas Frescal. Borelli e colaboradores (2006) isolaram cepas de *Candida* sp., *Rhodotorula* sp. e *Cryptococcus* sp., de amostras de queijo artesanal produzido na região da Serra da Canastra. A contaminação foi

proveniente do leite contaminado, dos equipamentos, dos manipuladores e falhas cometidas durante o processamento do queijo. Kebede e colaboradores (2007) identificaram cepas de *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Debaryomyces hansenii* em leites fermentados. Reis (2008) identificou 74 cepas de fungos isolados de bebidas lácteas fermentadas de diferentes marcas comerciais e sabores. Foram identificadas 4 espécies: *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Candida edax*, com prevalência de *Debaryomyces hansenii* (71 cepas).

Embora estudos da evolução e da diversidade de micro-organismos durante o processo de fabricação de produtos lácteos tenham sido realizados por diversos autores (MOREA; BARUZZI; COCCONCELLI, 1999; GATTI et al., 2003; COPPOLA et al., 2006; LAZZI et al., 2004), desconhece-se estudos disponíveis na literatura sobre a evolução de fungos leveduriformes contaminantes ao longo da cadeia produtiva de produtos lácteos. O estudo da evolução da biota contaminante presente no processo de fabricação de bebidas lácteas é importante para entender a interação entre os micro-organismos, diagnosticar os possíveis focos de contaminação e assim, propor medidas de controle para reduzir tais contaminações, conseqüentemente, contribuindo para a obtenção de produtos seguros para o consumo.

Neste contexto, os objetivos deste estudo foram: isolar e identificar os micro-organismos leveduriformes das amostras coletadas, durante as etapas de fabricação das bebidas lácteas, assim como do produto recém processado, com 20, 40 e 60 dias de estocagem (a 5°C), provenientes de dois laticínios (A e B); identificar os possíveis focos de contaminação, além de avaliar a evolução das espécies identificadas durante a fabricação do produto.

## **2 - Materiais e métodos**

### **2.1 - Obtenção e preparo das amostras**

Foram realizadas três coletas de amostras em dois laticínios (A e B), entre os meses de março e abril de 2009 no laticínio A e, no mesmo período do ano subsequente, no laticínio B. De acordo com o laticínio (A ou B) e o número

das coletas (1, 2 ou 3), as amostras foram identificadas como, A1, A2 e A3 para o laticínio A e B1, B2 e B3 para o laticínio B, seguidas da etapa de coleta (Tabela 1).

**Tabela 1** - Identificação das amostras coletadas em diferentes etapas de fabricação de bebidas lácteas fermentadas.

| Etapas do processo de fabricação |                                        | Laticínios |          |
|----------------------------------|----------------------------------------|------------|----------|
| 1                                | Recepção do leite                      | Ax 1, y    | Bx 1, y  |
| 2                                | Tratamento térmico                     | Ax 2, y    | Bx 3, y  |
| 3                                | Adição de soro, açúcar e estabilizante | Ax 3, y    | Bx 2, y  |
| 4                                | Adição da cultura láctea               | Ax 4, y    | Bx 4, y  |
| 5                                | Fermentação                            | Ax 5, y    | Bx 5, y  |
| 6                                | Adição de polpas de frutas             | Ax 6, y    | Bx 6, y  |
| 7                                | Produto recém processado               | Ax 7, y    | Bx 7, y  |
| 8                                | 20 dias de fabricação                  | Ax 8, y    | Bx 8, y  |
| 9                                | 40 dias de fabricação                  | Ax 9, y    | Bx 9, y  |
| 10                               | 60 dias de fabricação                  | Ax 10, y   | Bx 10, y |

**Legenda:** x = número da coleta (1, 2 ou 3), y = número do fungo leveduriforme isolado.

Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em caixas de material isotérmico contendo gel reciclável e transportadas de imediato para o Laboratório de Leite e Derivados UNESP - Campus de São José do Rio Preto para análise. A seguir, assepticamente 10,0 mL de cada amostra foram colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90,0 mL água peptonada (0,1 %) estéril, com posterior agitação (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta, foram realizadas as demais diluições decimais seriadas, utilizando-se o mesmo diluente. As diluições obtidas foram utilizadas, conforme o ensaio (HARRIGAN; MC CANCE, 1976; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1978).

## 2.2 - Isolamento e manutenção das culturas leveduriformes

Para o isolamento das colônias foi utilizado o método de inoculação por profundidade em Meio Para Levedura ou ágar MPL (2,0 % de glicose, 0,5 % de extrato de levedura, 1,0 % de cloreto de sódio, 0,23 % de fosfato de sódio

monobásico, 0,5 % de sulfato de amônio e 2,0 % de ágar), segundo *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* - ICMSF (1978). Foram empregadas as diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$ , em duplicata. Após solidificação as placas foram incubadas em estufa a 25°C por 120 horas.

As colônias leveduriformes selecionadas apresentavam diferentes tipos morfológicos (tamanho, cor, formato) e, a fim de conhecer àquelas predominantes, as colônias mais numerosas foram isoladas em maior proporção. Estas colônias foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para tubos contendo meio Gymp inclinado (2,0 % de glicose, 0,5 % de extrato de levedura, 1,0 % de extrato de malte, 0,2 % de fosfato de sódio monobásico e 2,0 % de ágar).

Após o pleno desenvolvimento dos cultivos (24, 48, 72 ou até 96 horas de incubação a 25°C), foi empregada a técnica de coloração de Gram, para verificar a pureza das culturas. Em seguida, cada cultivo recebeu um código de identificação: do laticínio (A ou B), do número da coleta e de qual etapa do processo de fabricação em que a amostra foi coletada, seguindo o número do fungo leveduriforme isolado da amostra (Tabela 1).

Os cultivos foram estocados em tubos de ensaio contendo meio Gymp inclinado, para posterior identificação. De cada cultivo-estoque em meio Gymp foram armazenados 2 exemplares em tubos de Eppendorf, contendo meio de cultura MPL e glicerina estéril, armazenados sob congelamento.

### **2.2.1 - Provas taxonômicas**

Para a identificação inicial dos gêneros foram considerados os testes de urease e de capacidade fermentativa. A identificação das espécies foi realizada pela estrutura morfológica, assimilação de inulina e resistência a cicloheximida, seguida dos outros ensaios. A interpretação dos resultados foram realizados conforme os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984) e Barnett; Payne; Yarrow (1983, 1990); Lacaz e colaboradores (2002).

### **2.2.1.1 - Provas morfológicas**

#### **2.2.1.1.1 - Microcultivo**

Foram utilizados os “kits” de microcultivo, previamente esterilizados, em placas de Petri contendo papel filtro levemente umedecido - 3cm<sup>2</sup>, palitos, lâmina e lamínula.

Na lâmina foi colocado 600,0 µL de ágar fubá estéril (4,0 % de fubá, 1,0 % de tween 80 e 2,0 % de ágar). Após solidificação do meio de cultura e com o auxílio de uma alça de platina, foram realizadas três sementeiras por esgotamento (em linha reta). Os “kits” foram incubados a 25°C por no mínimo 120 horas, até o pleno desenvolvimento dos micro-organismos, a fim de verificar o tipo morfológico da cultura por observação em microscópio óptico (LACAZ et al., 2002).

#### **2.2.1.1.2 - Produção de esporos**

Para verificação da produção de esporos foram utilizados o meio de Gorodkova (0,1 % de glicose, 1,0 % de peptona, 0,5 % de cloreto de sódio e 2,0 % de ágar) e o ágar acetato de McClary (0,1 % de glicose, 0,18 % de cloreto de potássio, 0,25 % de extrato de levedura, 0,82 % de acetato de sódio e 2,0 % de ágar). As placas de Petri foram mantidas a 25°C, com leituras periódicas de 7, 14 e 21 dias (KURTZMAN; FELL, 1998).

### **2.2.1.2 - Provas fisiológicas**

#### **2.2.1.2.1 - Capacidade fermentativa**

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

ambiente, com leituras de 24 horas, 7, 14 e 21 dias. Considerou-se resultado positivo com o preenchimento de gás de 1/3 a 3/3 do tubo de Durham e negativo quando não houvesse tal produção (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

#### **2.2.1.2.2 - Desenvolvimento em diversas temperaturas**

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

#### **2.2.1.2.3 - Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato**

Foi utilizado o *Yeast Carbon Base* 1,17 % (YCB-Difco) contendo 0,078 % de nitrato de potássio como fonte de nitrogênio e 2,0 % de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

#### **2.2.1.2.4 - 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 adicionado 50,0 % de glicose e para o outro 10,0 % de cloreto de sódio (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

#### **2.2.1.2.5 - 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, 2,0 % 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).

#### **2.2.1.2.6 - Síntese de amido**

Para a verificação da produção de compostos amilóides foi utilizado o ágar Sabouraud glicose (2,0 % de glicose, 1,0 % de peptona, 0,5 % de extrato de levedura e 2,0 % de ágar). 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).

#### **2.2.1.2.7 - Provas de assimilação de fontes de carbono**

Foram utilizadas 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 de 1,0 %, acrescidas ao *Yeast Nitrogen Base* 0,67 % (YNB-Difco) mais 2,0 % de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983, 1990).

#### **2.2.1.2.8 - Teste de urease**

De cada cultivo estoque, com o auxílio de uma alça de platina, uma porção foi semeada por esgotamento em placas de Petri contendo ágar MPL. Após incubação a 25°C por 120 horas, uma colônia foi isolada e transferida para tubos contendo o ágar uréia base, e incubados a 35°C por 120 horas. O aparecimento da cor *pink*, por toda a extensão do tubo, indicou resultado positivo, e da cor laranja, resultado negativo (LACAZ et al., 2002).

### 2.2.2 - Técnica de *Replica-plate*

A técnica de *Replica-plate* foi empregada para as provas descritas nos itens 2.2.1.1.2, 2.2.1.2.3 a 2.2.1.2.7.

Nos testes em que foram aplicados este método, as culturas após 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 cultura foi transferida 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 a 25°C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

## 3 - Resultados e discussão

Um total de cento e vinte (120) fungos leveduriformes foi isolado das amostras coletadas em ambos os laticínios avaliados (A e B), sendo onze (11) cepas isoladas das amostras coletadas no laticínio A (Tabela 2) e cento e nove (109), do laticínio B (Tabela 3).

**Tabela 2** - Codificação dos fungos leveduriformes isolados de amostras coletadas no laticínio A.

| Coletas                  | 1                         | 2                         | 3                                         |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|
|                          | A1 3,2; A1 3,3;<br>A1 3,5 | A2 1,1; A2 1,4;<br>A2 3,3 | A3 1,2; A3 3,3; A3<br>3,4; A3 3,5; A3 3,6 |
| <b>Total de isolados</b> | <b>3</b>                  | <b>3</b>                  | <b>5</b>                                  |

**Legenda:** Ax n,n1: A = laticínio A, x = número da coleta; n = etapa do processo de fabricação, da qual a amostra foi coletada, n1 = número da levedura isolada da amostra.

**Tabela 3** - Codificação de fungos leveduriformes isolados de amostras coletadas no laticínio B.

| Coletas                  | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          | B1 1,1; B1 1,2; B1 1,3; B1 1,4; B1 4,5; B1 4,6; B1 4,7; B1 5,8; B1 5,10; B1 5,11; B1 5,12; B1 7,13; B1 7,14; B1 7,15; B1 8,1; B1 8,2; B1 8,3; B1 8,4; B1 8,5; B1 8,6; B1 8,7; B1 8,8; B1 8,9; B1 8,10; B1 8,11; B1 8,12; B1 9,1; B1 9,2; B1 9,3; B1 9,5; B1 9,6; B1 9,7; B1 9,8; B1 9,10; B1 9,11; B1 9,12; B1 9,13; B1 9,14; B1 10,2; B1 10,3; B1 10,4; B1 10,5; B1 10,6; B1 10,7; B1 10,10; B1 10,13; B1 10,14; B1 10,15; B1 10,16 | B2 1,3; B2 1,4; B2 1,5; B2 6,6; B2 6,7; B2 6,8; B2 6,9; B2 6,10; B2 7,11; B2 7,12; B2 7,13; B2 7,14; B2 7,15; B2 7,16; B2 8,4; B2 8,5; B2 8,7; B2 8,8; B2 8,9; B2 8,10; B2 9,9; B2 9,10; B2 9,11; B2 10,1; B2 10,4; B2 10,6; B2 10,8; B2 10,9; B2 10,10; B2 10,11; B2 10,12; B2 10,13; B2 10,14; B2 10,15; B2 10,16; B2 10,17; B2 10,20; B2 10,21 | B3 6,1; B3 6,2; B3 7,3; B3 7,4; B3 7,5; B3 7,6; B3 7,7; B3 7,8; B3 7,9; B3 8,1; B3 8,2; B3 8,3; B3 8,4; B3 8,5; B3 8,6; B3 10,2; B3 10,3; B3 10,9; B3 10,10; B3 10,11; B3 10,12; B3 10,13 |
| <b>Total de isolados</b> | <b>49</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>38</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>22</b>                                                                                                                                                                                 |

**Legenda:** Bx n,n1: B = laticínio B, x = número da coleta; n = etapa do processo de fabricação, da qual a amostra foi coletada, n1 = número da levedura isolada da amostra.

### 3.1 - Testes morfológicos e fisiológicos

Foi feita a identificação das culturas de fungos leveduriformes isoladas, por meio dos testes taxonômicos (Tabelas 4 e 5), a fim de verificar as espécies contaminantes, a evolução da microbiota ao longo do processo de fabricação, assim como do produto acabado em diferentes tempos de estocagem.

**Tabela 4** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras do laticínio A.

| Testes / culturas                                                |                        | A1<br>3,2 | A1<br>3,3 | A1<br>3,5 | A2<br>1,1 | A2<br>1,4 | A2<br>3,3 | A3<br>1,2 | A3<br>3,3 | A3<br>3,4 | A3<br>3,5 | A3<br>3,6 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -         | +         | +         | -         | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +         | -         | -         | +         | +         | +         | +         | -         | -         | -         | -         |
|                                                                  | Maltose                | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |
|                                                                  | Sacarose               | -         | -         | -         | +         | -         | +         | -         | -         | -         | -         | -         |
|                                                                  | Lactose                | -         | -         | -         | +         | -         | +         | -         | -         | -         | -         | -         |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +         | -         | -         | +         | +         | +         | +         | -         | -         | -         | -         |
|                                                                  | 40°C                   | +         | -         | -         | +         | +         | +         | +         | -         | -         | -         | -         |
|                                                                  | 45°C                   | -         | -         | -         | -         | +         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50 %           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
|                                                                  | NaCl 10 %              | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -         | +         | +         | -         | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +         |

**Legenda:** Ax n,y onde: A = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras do laticínio B.

| Testes / culturas                                                | B1<br>1,1 | B1<br>1,2 | B1<br>1,3 | B1<br>1,4 | B1<br>4,5 | B1<br>4,6 | B1<br>4,7 | B1<br>5,8 | B1<br>5,10 | B1<br>5,11 | B1<br>5,12 | B1<br>7,13 |
|------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          |
| <b>Produção de esporos</b>                                       | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |
| Glicose                                                          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| Maltose                                                          | -         | -         | -         | +         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | +          |
| Sacarose                                                         | +         | +         | +         | +         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          |
| Lactose                                                          | +         | +         | +         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |
| 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                                                          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |
| 35°C                                                             | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| 40°C                                                             | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| 45°C                                                             | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | -          |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |
| Cicloheximida 100 ppm                                            | +         | +         | +         | -         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | -          |
| Cicloheximida 1000 ppm                                           | +         | +         | +         | -         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | -          |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |
| Glicose 50%                                                      | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| NaCl 10%                                                         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Síntese de amido</b>                                          | -         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Teste de Urease</b>                                           | -         | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | -          |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B1<br>7,14 | B1<br>7,15 | B1<br>8,1 | B1<br>8,2 | B1<br>8,3 | B1<br>8,4 | B1<br>8,5 | B1<br>8,6 | B1<br>8,7 | B1<br>8,8 | B1<br>8,9 | B1<br>8,10 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
|                                                                  | Maltose                | +          | +          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          |
|                                                                  | Sacarose               | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          |
|                                                                  | Lactose                | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
|                                                                  | 40°C                   | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         | +          |
|                                                                  | 45°C                   | -          | -          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         | -          |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50%            | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
|                                                                  | NaCl 10%               | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | -          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B1<br>8,11 | B1<br>8,12 | B1<br>9,1 | B1<br>9,2 | B1<br>9,3 | B1<br>9,5 | B1<br>9,6 | B1<br>9,7 | B1<br>9,8 | B1<br>9,10 | B1<br>9,11 | B1<br>9,12 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
|                                                                  | Maltose                | +          | -          | -         | -         | +         | +         | -         | -         | -         | -          | -          | -          |
|                                                                  | Sacarose               | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          |
|                                                                  | Lactose                | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
|                                                                  | 40°C                   | -          | +          | +         | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
|                                                                  | 45°C                   | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | +          | -          | +         | +         | +         | +         | +         | -         | +         | +          | +          | -          |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | +          | -          | +         | +         | +         | +         | +         | -         | +         | +          | +          | -          |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50%            | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
|                                                                  | NaCl 10%               | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Tests / culturas                                                 |                        | B1<br>9,13 | B1<br>9,14 | B1<br>10,2 | B1<br>10,3 | B1<br>10,4 | B1<br>10,5 | B1<br>10,6 | B1<br>10,7 | B1<br>10,10 | B1<br>10,13 | B1<br>10,14 | B1<br>10,15 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | Maltose                | +          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
|                                                                  | Sacarose               | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
|                                                                  | Lactose                | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | 40°C                   | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | 45°C                   | -          | -          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | -           |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | +          | +          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | +          | +          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50%            | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | NaCl 10%               | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B1<br>10,16 | B2<br>1,3 | B2<br>1,4 | B2<br>1,5 | B2<br>6,6 | B2<br>6,7 | B2<br>6,8 | B2<br>6,9 | B2<br>6,10 | B2<br>7,11 | B2<br>7,12 | B2<br>7,13 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +           | -         | -         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
|                                                                  | Maltose                | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | +         | -          | -          | -          | -          |
|                                                                  | Sacarose               | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | +         | -          | -          | -          | -          |
|                                                                  | Lactose                | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
|                                                                  | 40°C                   | +           | -         | -         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
|                                                                  | 45°C                   | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | -           | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +         | +          | -          | +          | -          |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | -           | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +         | +          | -          | +          | -          |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50%            | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
|                                                                  | NaCl 10%               | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -           | +         | +         | -         | +         | +         | +         | -         | +          | -          | -          | -          |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B2<br>7,14 | B2<br>7,15 | B2<br>7,16 | B2<br>8,4 | B2<br>8,5 | B2<br>8,7 | B2<br>8,8 | B2<br>8,9 | B2<br>8,10 | B2<br>9,9 | B2<br>9,10 | B2<br>9,11 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -          | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -         | -          | -          |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
|                                                                  | Maltose                | -          | +          | +          | -         | -         | +         | +         | -         | -          | -         | +          | -          |
|                                                                  | Sacarose               | -          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | -          | +          |
|                                                                  | Lactose                | -          | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -         | -          | -          |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
|                                                                  | 40°C                   | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
|                                                                  | 45°C                   | -          | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -         | -          | -          |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | -          | +          | +          | -         | -         | +         | +         | -         | -          | -         | +          | -          |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | -          | +          | +          | -         | -         | +         | +         | -         | -          | -         | +          | -          |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glucose 50%            | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
|                                                                  | NaCl 10%               | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +          | +          | +          | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +         | +          | +          |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -          | -          | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -         | -          | -          |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B2<br>10,1 | B2<br>10,4 | B2<br>10,6 | B2<br>10,8 | B2<br>10,9 | B2<br>10,10 | B2<br>10,11 | B2<br>10,12 | B2<br>10,13 | B2<br>10,14 | B2<br>10,15 | B2<br>10,16 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | Maltose                | -          | -          | +          | -          | -          | -           | +           | -           | +           | +           | +           | -           |
|                                                                  | Sacarose               | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
|                                                                  | Lactose                | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | 40°C                   | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | 45°C                   | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | -          | -          | +          | -          | -          | -           | +           | -           | -           | -           | -           | -           |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | -          | -          | +          | -          | -          | -           | +           | -           | -           | -           | -           | -           |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glucose 50%            | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | NaCl 10%               | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +          | +          | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | +           |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           | -           | +           | -           | -           | -           |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B2<br>10,17 | B2<br>10,20 | B2<br>10,21 | B3<br>6,1 | B3<br>6,2 | B3<br>7,3 | B3<br>7,4 | B3<br>7,5 | B3<br>7,6 | B3<br>7,7 | B3<br>7,8 | B3<br>7,9 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -           | -           | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         |
|                                                                  | Maltose                | -           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         |
|                                                                  | Sacarose               | -           | -           | -           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         |
|                                                                  | Lactose                | -           | -           | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
|                                                                  | 40°C                   | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         |
|                                                                  | 45°C                   | -           | -           | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | -           | -           | -           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | -           | -           | -           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | -         |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50%            | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
|                                                                  | NaCl 10%               | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +           | +           | +           | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +         |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -           | -           | -           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | +         |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

**Tabela 5** - Identificação segundo critérios bioquímicos e morfológicos dos fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no Laticínio B (continuação).

| Testes / culturas                                                |                        | B3<br>8,1 | B3<br>8,2 | B3<br>8,3 | B3<br>8,4 | B3<br>8,5 | B3<br>8,6 | B3<br>10,2 | B3<br>10,3 | B3<br>10,9 | B3<br>10,10 | B3<br>10,11 | B3<br>10,12 | B3<br>10,13 |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Colônias pink</b>                                             |                        | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
| <b>Produção de esporos</b>                                       |                        | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Capacidade fermentativa</b>                                   | Glicose                | +         | +         | +         | +         | +         | -         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | Maltose                | +         | +         | +         | +         | +         | -         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | Sacarose               | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
|                                                                  | Lactose                | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |
| <b>Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio</b>          | 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                | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Desenvolvimento em diferentes temperaturas</b>                | 35°C                   | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | 40°C                   | +         | +         | +         | +         | +         | -         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | 45°C                   | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | +           | -           | -           | -           |
| <b>Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida</b> | Cicloheximida 100 ppm  | +         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -           | +           | -           | +           |
|                                                                  | Cicloheximida 1000 ppm | +         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -           | +           | -           | +           |
| <b>Resistência a pressão osmótica</b>                            | Glicose 50%            | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
|                                                                  | NaCl 10%               | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Síntese de amido</b>                                          |                        | +         | +         | +         | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +           | +           | +           | +           |
| <b>Teste de Urease</b>                                           |                        | -         | -         | -         | -         | -         | +         | -          | -          | -          | -           | -           | -           | -           |

**Legenda:** Bx n,y onde: B = laticínio de onde as amostras foram coletadas; x = número da coleta; n = número da etapa onde foi coletada a amostra; y = número da levedura isolada.

### 3.1.1 - Fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no laticínio A

As espécies isoladas nas coletas 1 e 3 foram identificadas como *Candida krusei* (A1 3,2; A3 1,2) e *Rhodotorula glutinis* (A1 3,3; A1 3,5; A3 3,3; A3 3,4; A3 3,5; A3 3,6), diferentes daquelas encontradas nas amostras da coleta 2, *Candida pseudotropicalis* (A2 1,1 e A2 3,3) e *Candida guilliermondii* (A2 1,4).

As espécies classificadas como *Candida krusei* apresentaram cadeias de células alongadas (pseudo-hifas) ramificadas em ágar fubá; espécies fermentadoras exclusivamente de glicose; não assimilaram inulina e, demonstraram discrepância quanto à assimilação de nitrato e cicloheximida. Tais espécies foram isoladas apenas de duas amostras: daquela adicionada de soro de leite, açúcar e estabilizante e de leite cru, das coletas 1 e 3 respectivamente. Observou-se, portanto, que esses micro-organismos não foram capazes de se perpetuar ao longo da cadeia produtiva, pois, após a adição da cultura lática (A1 3,2) e após a pasteurização (A3 1,2) não foram mais encontrados.

As cepas identificadas como *Rhodotorula glutinis* apresentaram aspecto mucóide ou pastoso e coloração característica (pigmentos carotenóides vermelhos), ausência de capacidade fermentativa, hidrolisaram a uréia; assimilaram o nitrato e não o amido solúvel. Foi possível isolá-las de amostras das coletas 1 e 3, ambas advindas da etapa da adição de soro, açúcar e estabilizante (A1 3,3; A1 3,5; A3 3,3; A3 3,4; A3 3,5; A3 3,6). Após a adição da cultura lática esses micro-organismos não mais foram encontrados, o que evidencia a prevalência das bactérias láticas sobre os fungos leveduriformes.

Além disso, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) foram efetivas durante toda a linha de processamento das bebidas lácteas, não oferecendo condições para o desenvolvimento e perpetuação dos contaminantes (REIS, PENNA, 2012, dados não publicados).

A espécie definida como *Candida pseudotropicalis* é a única capaz de fermentar a lactose e não a maltose. Porém, as cepas identificadas apresentaram discrepâncias quanto à assimilação de nitrato e não de inulina. As cepas foram isoladas das amostras de leite cru e daquelas adicionadas de

soro, açúcar e estabilizante (A2 1,1 e A2 3,3), provenientes da coleta 2. Pelo comportamento da espécie, é possível pressupor que após a etapa de pasteurização houve recontaminação, possivelmente, por meio de alguns dos ingredientes adicionados, como por exemplo, do soro de leite, pois não é avaliado microbiologicamente; ou ainda, do manipulador no momento do preparo do produto.

A única cepa classificada como *Candida guilliermondii* (A2 1,4) apresentou pseudo-hifas abundantes alongadas e ramificadas, fermentou apenas a glicose, sendo variável quanto à da sacarose, assimilou inulina e cicloheximida, características marcantes da espécie. Embora tenha apresentado discrepância somente quanto à assimilação de nitrato.

Tem sido freqüente o isolamento de fungos leveduriformes pertencentes ao gênero *Candida* sp. (*C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. pseudotropicalis*) e *Rhodotorula* sp., em produtos lácteos, como evidenciam vários estudos (LACAZ et al., 2002; SANTOS; MARIN, 2005; KRUKOSWKI, 2006; MELVILLE et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2010; LANGONI et al., 2011). Trata-se de um agente oportunista causador de mastite animal com ocorrência ambiental, sendo isolado facilmente a partir de equipamentos de ordenha, epitélio de tetos dos animais e do ambiente da sala de ordenha.

### **3.1.2 - Fungos leveduriformes isolados das amostras coletadas no laticínio B**

Durante as três coletas das amostras no laticínio B, foram isolados cento e nove (109) cultivos de leveduriformes. Foram 49 isolados das amostras da coleta 1; 38 das amostras da coleta 2 e 22 da coleta 3.

De maneira geral, foi possível constatar contaminação por fungos leveduriformes, nas amostras coletadas na maioria das etapas do processo de fabricação das bebidas lácteas fermentadas, ou seja, desde a recepção do leite cru até o produto final, cuja distribuição das espécies está apresentada na Tabela 6. Houve predomínio de algumas espécies pertencentes ao gênero *Candida*.

**Tabela 6** - Distribuição dos fungos leveduriformes isolados das amostras do laticínio B.

| Amostras                                        | Coleta 1                                                              | Coleta 2                                                                                          | Coleta 3                                                         |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Leite cru                                       | <i>Candida pseudotropicalis</i> (3),<br><i>Candida tropicalis</i> (1) | <i>Candida guilliermondii</i> (1),<br><i>Geotrichum candidum</i> (2)                              | -                                                                |
| Leite pasteurizado                              | -                                                                     | -                                                                                                 | -                                                                |
| Adição de soro de leite, açúcar e estabilizante | <i>Candida krusei</i> (3)                                             | -                                                                                                 | -                                                                |
| Adição da cultura lática                        | -                                                                     | -                                                                                                 | -                                                                |
| Fermentação                                     | <i>Candida krusei</i> (4)                                             | -                                                                                                 | -                                                                |
| Adição de polpas de frutas                      | -                                                                     | <i>Candida krusei</i> (4),<br><i>Candida tropicalis</i> (1)                                       | <i>Candida tropicalis</i> (2)                                    |
| Produto recém processado                        | <i>Candida tropicalis</i> (3)                                         | <i>Candida guilliermondii</i> (3),<br><i>Candida tropicalis</i> (2),<br><i>Candida krusei</i> (1) | <i>Candida tropicalis</i> (6),<br><i>Geotrichum candidum</i> (1) |
| Produto com 20 dias de estocagem                | <i>Candida guilliermondii</i> (9),<br><i>Candida tropicalis</i> (3)   | <i>Candida guilliermondii</i> (4),<br><i>Candida tropicalis</i> (2)                               | <i>Candida tropicalis</i> (5),<br><i>Geotrichum candidum</i> (1) |
| Produto com 40 dias de estocagem                | <i>Candida guilliermondii</i> (9),<br><i>Candida tropicalis</i> (3)   | <i>Candida guilliermondii</i> (2),<br><i>Candida tropicalis</i> (1)                               | -                                                                |
| Produto com 60 dias de estocagem                | <i>Candida guilliermondii</i> (11)                                    | <i>Candida guilliermondii</i> (8),<br><i>Candida tropicalis</i> (2),<br><i>Candida krusei</i> (5) | <i>Candida tropicalis</i> (7)                                    |
| <b>Total</b>                                    | <b>49</b>                                                             | <b>38</b>                                                                                         | <b>22</b>                                                        |

**Legenda:** (x) = número de cepas identificadas em cada etapa.

O gênero *Candida* possui espécies de leveduriformes que habitam naturalmente o homem, sendo encontrado na pele, mucosas, trato gastrointestinal e genital, entretanto em situações especiais, como em doenças crônicas ou quadro de imunodeficiência, pode se manifestar a candidíase ou candidose em diversos sítios anatômicos. Existem, aproximadamente, 20 espécies de *Candida* reconhecidamente patogênicas, sendo que a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares. Esta espécie é considerada também o mais comumente isolado fúngico do trato urinário, sendo responsável por, aproximadamente, 70,0 % dos casos clínicos, seguido de espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, entre outras (LACAZ et al., 2002; PASSOS et al., 2005; AKINBIYI; WATSON; FEYI-WABOSO, 2008; ACHKAR; FRIES, 2010; RODRIGUES; MEZZARI; FUENTEFRÍA, 2011).

Os principais micro-organismos envolvidos nas mastites micóticas são: *Rhodotorula* sp., *Candida krusei*, *Candida tropicalis* entre outros. A contaminação dos equipamentos da ordenha por estes micro-organismos pode causar infecções em um grande número de animais, embora normalmente os casos de mastite micótica ocorram de forma isolada. Os fungos podem estar presentes como contaminantes de medicamentos, diluentes de antibióticos, na água de lavagem dos equipamentos de ordenha ou ainda, nas mãos do ordenhador (KRUKOWSKI et al., 2000; BRANCO, 2010).

As espécies isoladas das amostras de leite cru foram: *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Geotrichum candidum*.

A *Candida pseudotropicalis* é a única espécie capaz de fermentar a lactose e não a maltose, assimilar a inulina e apresentar resistência à cicloheximida. Essa espécie foi isolada somente das amostras de leite cru, possivelmente não resistiu às condições de fabricação (adição de ingredientes ou pasteurização, por exemplo) ou por predominância de outros micro-organismos (contaminantes ou não) inerentes ao processo.

As cepas de *Candida tropicalis* foram isoladas das amostras de leite cru, das adicionadas de polpas de frutas, do produto recém processado, com 20, 40 e 60 dias de estocagem. Estas apresentaram micélios e pseudomicélios com blastoconídeos ovóides aos cachos, em ágar fubá; fermentaram glicose,

maltose e sacarose (variável), e não assimilaram a inulina e a cicloheximida (variável). Porém, apresentaram discrepâncias quanto à assimilação de nitrato.

Foi isolada *Candida guilliermondii* das amostras de leite cru e do produto com 20, 40 e 60 dias de estocagem, confirmando sua prevalência sobre *C. tropicalis*, que se encontraram em menor proporção (Tabela 6).

As cepas de *C. guilliermondii* apresentaram pseudo-hifas formadas por células alongadas abundantes e ramificadas com blastoconídeos esféricos nas extremidades em ágar fubá, fermentaram somente a glicose; assimilaram inulina e apresentaram discrepâncias quanto à assimilação de cicloheximida para algumas cepas. Desde as amostras do produto acabado, observou-se maior frequência das cepas de *C. guilliermondii* (Tabela 6), prevalecendo sobre os outros micro-organismos também identificados.

As duas cepas identificadas como *Geotrichum candidum* (coleta 2) apresentaram certas diferenças entre si, com relação à assimilação de algumas fontes de carbono (galactitol, L-sorbose, D-ribose, D-xilose, celobiose, melezitose, amido solúvel e galactitol). Porém, ambas as cepas foram incapazes de fermentar os açúcares, assimilaram inulina e não a cicloheximida, além de hidrolisar a uréia e apresentaram sensibilidade a 40 e 45°C. Essa espécie não mais foi encontrada nas amostras das etapas subseqüentes, provavelmente pela competição com outros micro-organismos presentes.

Cepas de *Geotrichum candidum* também foram isoladas das amostras da coleta 3; do produto recém processado e com 20 dias de estocagem. Diferente das cepas isoladas das amostras da coleta 2, essas resistiram às condições de estocagem sob refrigeração.

O *Geotrichum candidum* pode ser isolado em condições normais do escarro, da pele, do leite e de uma grande variedade de frutas. Porém é considerado, predominantemente, um fungo oportunista, ocorrendo também em casos de pacientes imunocomprometidos ou tratados em longo prazo com corticóides e antibióticos, podendo então, serem oriundos dos manipuladores. É uma das poucas espécies considerada patógena (LACAZ et al., 2002).

Diversas espécies pertencentes aos gêneros *Candida* sp. e *Geotrichum* sp., geralmente estão associadas a quadros infecciosos por fungos de baixa virulência, que convivem pacificamente com o hospedeiro, mas ao encontrar condições favoráveis, como distúrbios do sistema imunológico, desenvolvem

seu poder patogênico, invadindo os tecidos (GROLL; WALSH, 2001; LACAZ et al., 2002; RUZ-PERES et al., 2010).

Cepas de *Candida krusei* foram isoladas das amostras adicionadas de soro, açúcar e estabilizante e das coletadas após a fermentação, possivelmente pela prevalência de outros micro-organismos (Tabela 6, coleta 1). Na coleta 2, 26,3 % das cepas identificadas pertencem à *C. krusei*. As cepas isoladas apresentaram como características básicas: cadeias de células alongadas (pseudo-hifas) ramificadas em ágar fubá, além de hidrolisar a uréia (variável), e não assimilar inulina. Porém, apresentaram discrepâncias com relação à assimilação de nitrato e cicloheximida.

Branco (2010) investigou a ocorrência de fungos em leite de vaca, provenientes de propriedades leiteiras, e constatou a presença de leveduriformes do gênero *Candida* nas amostras de leite analisadas. Isso representa um sério problema para os proprietários e os consumidores do leite, pois os fungos *Candida krusei*, *Candida tropicalis* dentre outras espécies encontradas, são agentes que podem causar doenças, bem como interferir nos procedimentos de elaboração de vários produtos lácteos.

Observou-se situações em que uma cepa do fungo leveduriforme foi identificado na amostra em uma determinada etapa, mas não foi encontrado nas amostras das etapas subseqüentes (Tabela 6). Diversos fatores podem influenciar nesta evolução: baixa resistência ou competitividade entre os micro-organismos, elevados níveis de contaminação e principalmente a prevalência das bactérias presentes sobre os fungos. No caso específico do laticínio B, a elevada contaminação das amostras poderia ter comprometido a integridade do isolamento, resultando em menor a ocorrência e freqüência de algumas espécies.

A incidência de *Candida* sp. em produtos lácteos também foi observada por diversos autores (SILVA, 2003; KEBEDE et al., 2007; COSTA et al, 2008; REIS, 2008).

A má qualidade da matéria-prima, a aplicação das BPF de forma inadequada, a falta de treinamento e de conscientização dos funcionários, infra-estrutura deficiente, além de outras irregularidades (REIS; PENNA, 2012, dados não publicados), contribuíram diretamente para o comprometimento da qualidade do produto final.

Embora a detecção da presença de fungos leveduriformes seja indício da utilização de matérias-primas de má qualidade ou falhas higiênicas durante o processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas, sua avaliação não consta como um dos parâmetros exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2001).

Este diagnóstico demonstrou as origens das contaminações de fungos leveduriformes, podendo ser utilizado para a aplicação de medidas preventivas e corretivas, a fim de reduzir a incidência de contaminantes.

#### 4 - Conclusão

Os fungos leveduriformes identificados durante o processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas são: *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis* e *Geotrichum candidum*.

As características intrínsecas da bebida láctea fermentada e características extrínsecas de fabricação são decisivas para a ocorrência e permanência dos fungos leveduriformes.

#### 5 - Referências bibliográficas

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.

AKINBIYI, A. A.; WATSON, R.; FEYI-WABOSO, P. Prevalence of *Candida albicans* and bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women in South Yorkshire, United Kingdom. Outcome of a prospective study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Berlin, v. 278, n. 5, p. 463-466, 2008.

ÁLVAREZ-MARTÍN, P. et al. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 1, p. 62-70, 2008.

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.

BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.

BRANCO, M. P. C. **Qualidade da água e do leite em propriedades leiteiras no município de Amargosa, Bahia**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Palmas, 2010.

CAVALCANTE, R. V. et al. Mastite bovina: principais agentes isolados no laboratório de doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos/UFRPE. **X Jornada de Ensino, Pesquisa E Extensão - JEPEX 2010 - UFRPE**, Recife, 18 a 22 de outubro, 2010.

COPPOLA, S. et al. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 73, n. 1-4, p. 01-09, 2006.

COSTA, G. M. P. et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1938-1942, 2008.

GATTI, M. et al. Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used Parmigiano Reggiano cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 1-6, p. 463-470, 2003.

GAUDIE, C. M.; WRAGG, P. N.; BARBER, A. M. Outbreak of disease due to *Candida krusei* in a small dairy herd in the UK. **Veterinary Record**, London, v. 165, n. 18, p. 535-537, 2009.

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 7, n. 2, p. 8-24, 2001.

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

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

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.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

KAVAS, G. et al. Characterization of yeasts isolated from artisanal Turkish dairy products. **International Journal of Dairy Sciences**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2006.

KEBEDE, A. et al. The Effect of Incubation temperature on the survival and growth of yeasts in sethemi, south African naturally fermented milk. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 45, n. 1, p. 21-26, 2007.

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

KRUKOSWIKI, H. Yeast and algae isolated from cows with mastitis in south eastern part of Poland. **Journal Veterinary Sciences**, Utrecht, v. 9, n. 3, p. 181-184, 2006.

KRUKOWSKI, H. et al. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. **Mycopathologia**, Den Haag, v.150, p.5-7, 2000.

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

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. Savier Editora de Livros Médicos Ltda, 9ª Edição, 2002.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LAZZI, C. et al. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 1-6, p. 481-490, 2004.

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

MARTINS, R. P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MELVILLE, P. A. et al. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 295-301, 2006.

MOREA, M.; BARUZZI, F.; COCCOCELLI, P. S. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in tradicional Mozzarella cheese processing. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 2-6, p. 574-582, 1999.

PASSOS, X. S. et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. São Paulo, v. 100, n. 8, p. 925-928, 2005.

PAULA, A. T. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado)-Programa

de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

REIS, J. A. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em bebidas lácteas fermentadas, adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

RODRIGUES, D.; MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A. M. Candidúria: revisão atual. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v. 24, n. 2, p. 142-150, 2011.

RUZ-PERES, M. et al. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 62-70, 2010.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, n. 1-4, v. 159, p. 251-253. 2005.

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

SILVA, J. V. **Qualidade microbiológica de ricota e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo Minas Frescal**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

SPANAMBERG, A. et al. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 282-290, 2009

VILJOEN, B. C. et al. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 12, p. 37-44, 2001.

WAWRON, W.; SZCZUBIAL, M. Treating mastitis mycotica in cows. **Medycyna Weterynaryjna**, Warszawa, v. 57, n. 1, p. 863-866, 2001.

## **CAPÍTULO IV**

**Comportamento *in vitro* e *in situ* de culturas  
probióticas sobre micro-organismos leveduriformes**

## RESUMO

A redução do uso de aditivos químicos tem sido uma tendência das indústrias para atender o mercado consumidor, que busca alimentos mais saudáveis. O emprego de bactérias probióticas como conservantes naturais ou bioconservantes tem sido muito explorado pelo setor de alimentos, pois, quando adicionadas em lácteos fermentados, produzem compostos antagonistas, atuando como inibidores dos indesejáveis. Os objetivos deste estudo foram: avaliar o comportamento *in vitro* das culturas probióticas comerciais: *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Lactobacillus casei* (Lc-1) sobre fungos leveduriformes isolados de bebidas lácteas comerciais: *Candida edax*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii* e para os leveduriformes sensíveis, verificar a ação dessas culturas em bebidas lácteas fermentadas (*in situ*), além de monitorar o comportamento de pós-acidificação e a viabilidade da microbiota durante estocagem a 5°C. O comportamento *in vitro* das culturas probióticas de Bb-12, La-5 e Lc-1 foi avaliado por meio do teste de perfuração e difusão em ágar, sendo empregados dois tratamentos: (1) diferentes densidades populacionais dos probióticos e (2) sobrenadante livre de células (SLC) e sobrenadante livre de células concentrado (SLCC). A ação antagonista foi observada pela inibição do desenvolvimento dos leveduriformes. No tratamento 1, todos os cultivos probióticos de Bb-12, La-5 e Lc-1, com diferentes densidades populacionais, não apresentaram comportamento antagonista sobre os fungos leveduriformes testados. No tratamento 2, o SLC e o SLCC de todos os cultivos de probióticos apresentaram antagonismo sobre *C. albidus* e, o SLC e o SLCC de Bb-12 e Lc-1 sobre *C. laurentii*. Apesar do antagonismo apresentado pelos probióticos, foi constatada a interação positiva do SLC e o SLCC de Bb-12, La-5 e Lc-1 com todas as culturas de *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii*. Nos testes *in situ*, foram realizados cinco processamentos de bebidas lácteas fermentadas pelos probióticos Bb-12, La-5 e Lc-1 e inoculadas com *C. albidus* e, bebidas lácteas fermentadas com Lc-1 e Bb-12 e inoculadas com *C. laurentii*. Em todas as bebidas lácteas produzidas foi constatada ausência dos leveduriformes testados até os 60 dias de estocagem. A presença dos fungos leveduriformes influenciou nos valores de pH e da acidez durante a estocagem refrigerada, além de interferir no tempo

de fermentação. Os resultados obtidos demonstraram o potencial das culturas probióticas comerciais Bb-12, La-5 e Lc-1 para serem utilizadas como bioconservantes de produtos lácteos, oferecendo produtos seguros com ampla vida de prateleira.

**Palavras-chave:** Antagonismo, Bioconservação de alimentos, Probióticos, Fungos leveduriformes.

## 1 - Introdução

Nos últimos anos, a popularidade das bebidas lácteas se deve a diversos fatores: ao maior nível de informações sobre os benefícios nutricionais (importante fonte de cálcio e à qualidade das proteínas), por apresentar baixa viscosidade, sendo consumida como bebida suave e refrescante, ao menor custo do produto para o fabricante e à redução do preço final para o consumidor (VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000; SANTOS; FERREIRA, 2001; FERREIRA, 2003; THAMER; PENNA, 2006; MARCHIORI, 2006; PAULA, 2010; CALDEIRA et al., 2010; PENNA, 2010).

Apesar da relação direta com a promoção da saúde, as bebidas lácteas comportam-se como excelentes meios para o desenvolvimento de certos micro-organismos indesejáveis. A riqueza de nutrientes, o baixo valor de pH e a elevada concentração de ácido láctico são meios propícios para o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes, especialmente fungos, pois, quando presentes tornam o produto inadequado para o consumo, ou ainda, caso seja consumido, pode afetar a saúde dos consumidores.

Certas bactérias probióticas quando adicionadas em produtos lácteos fermentados, produzem compostos orgânicos antimicrobianos, atuando como inibidores no desenvolvimento de alguns micro-organismos deteriorantes e ou patogênicos. As vias de fermentação da glicose mais utilizadas por bactérias acidoláticas homo e heterofermentativas são: a glicólise e a fosfocetolase. Por essas vias são sintetizados e secretados diversos compostos orgânicos com propriedades antagonistas, tais como os ácidos acético, láctico e propiônico, diacetil, succinato e bacteriocinas, capazes de inibir micro-organismos contaminantes (DE MUYNCK et al., 2004; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Estudos envolvendo as bactérias probióticas capazes de inibir micro-organismos patogênicos e deteriorantes têm sido desenvolvidos por alguns pesquisadores. Yang e Clausen (2005) observaram uma redução de 95,0 a 100,0 % no desenvolvimento de fungos, na presença de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* e *Lactobacillus acidophilus*. Além disso, o sobrenadante dessas culturas apresentou quatro compostos desconhecidos, que

apresentaram atividade antifúngica, resistência ao aquecimento a 121°C e atividade após a neutralização.

Osuntoki, Ejide, Omonigbehin (2008) isolaram espécies do gênero *Lactobacillus* presentes em produtos lácteos fermentados e avaliaram a atividade inibitória sobre algumas espécies enteropatogênicas. *L. casei* apresentou ação inibitória mais eficiente sobre *L. monocytogenes* quando comparado com *S. enterica* Typhimurium.

Em virtude de um mercado consumidor que busca alimentos saudáveis e a consequente preocupação das indústrias em reduzir o uso de aditivos químicos, estudos do emprego de bactérias probióticas como bioconservantes, atuando como inibidores de micro-organismos indesejáveis são fundamentais para atender tais expectativas. Evidentemente a conservação biológica não substitui as Boas Práticas de Fabricação (BPF), mas oferece uma ferramenta adicional para melhorar a segurança do alimento, além de aumentar sua vida útil.

Entretanto, estudos específicos a respeito do comportamento de micro-organismos probióticos sobre fungos leveduriformes em derivados lácteos são escassos. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram: avaliar o comportamento *in vitro* das culturas probióticas comerciais: *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Lactobacillus casei* (Lc-1) sobre *Candida edax*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii*, e para os leveduriformes sensíveis, verificar a ação dessas culturas comerciais em bebidas lácteas fermentadas (*in situ*), além de monitorar o comportamento de pós-acidificação e a viabilidade da microbiota durante estocagem a 5°C.

## **2 - Materiais e métodos**

### **2.1 - Culturas probióticas**

Foram utilizadas as culturas probióticas: *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Lactobacillus casei* (Lc-1), fornecidas pela Christian Hansen® (Valinhos, Brasil).

As culturas para processamento industrial (25,0 gramas), liofilizadas e para uso direto, foram suspensas assepticamente em 1000,0 mL de leite, previamente submetido à esterilização em autoclave (121°C, 1atm/15 minutos). Em seguida, o leite estéril contendo as culturas foi distribuído em tubos de ensaio esterilizados, com capacidade para 50,0 mL, adicionado de glicerol (100,0 %) estéril na proporção de 10,0 % como crioprotetor, e posteriormente mantidos em congelador a -18°C.

Na ocasião do uso, cada cultura probiótica foi retirada do congelamento e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos.

### **2.1.1 - Viabilidade das culturas probióticas**

Para a ativação, das culturas descongeladas, foi transferido assepticamente 1,0 mL para tubos de ensaio contendo os meios de cultivos específicos, para o melhor desenvolvimento de cada uma das culturas probióticas: Bb-12 - 9,0 mL de caldo MRS-IM (Acumedia) com glicose, adicionado de solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína, sob anaerobiose; La-5 - 9,0 mL de caldo MRS (Acumedia) com maltose, sob aerobiose; Lc-1 - 9,0 mL de caldo MRS (Acumedia) acidificado (pH 5,4), sob anaerobiose.

Os ensaios foram incubados a 37°C por 72 horas, conforme *International Dairy Federation* - IDF, 1995; 1997 e Balduino, Oliveira, Haully (1999).

Para a determinação da viabilidade, após o período de incubação, foram feitas as diluições decimais seriadas até  $10^{-10}$ , em água peptonada estéril a 0,1%, para a determinação da viabilidade dos micro-organismos. Para tanto, foi inoculado 1,0 mL de cada cultivo, por profundidade e em duplicata, em placas contendo os meios específicos para cada cultura, citados anteriormente, adicionados de ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, sob as condições atmosféricas características de cada cultivo probiótico (OSTLIE; HELLAND; NARVHUS, 2003).

A leitura foi realizada com auxílio de um contador de colônias e multiplicada pela recíproca da diluição, sendo o resultado expresso como número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). As UFC's obtidas foram transformadas em logaritmo de base 10.

### 2.1.2 - Preparo do sobrenadante livre de células (SLC) e do sobrenadante livre de células concentrado (SLCC)

Cada cultura probiótica ativada foi transferida na proporção 10,0% ( $10^{11}$  -  $10^{13}$  UFC/mL) para um frasco de Erlenmeyer contendo caldo MRS-IM com glicose, adicionado de solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína para Bb-12, sob anaerobiose; caldo MRS com maltose para La-5, sob aerobiose, e caldo MRS acidificado (pH 5,4) para Lc-1, sob anaerobiose. Os ensaios foram incubados a 37°C por 72 horas (IDF, 1995; 1997; BALDUÍNO; OLIVEIRA; HAULY, 1999). Após o período de incubação, os caldos foram centrifugados a 12.317 g x por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram divididos em duas porções: uma foi utilizada sem modificação (Sobrenadante Livre de Células - SLC) e a outra, concentrada cinco vezes, em evaporador rotativo, a 55°C (SLCC). Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para avaliar o comportamento antimicrobiano *in vitro* (PRADO et al., 2000; NARDI et al., 2005).

### 2.2 - Culturas de fungos leveduriformes

Foram utilizados os fungos leveduriformes: *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (12 culturas), *Candida edax* (1 cultura), *Cryptococcus albidus* (1 cultura) e *Cryptococcus laurentii* (1 cultura), previamente isoladas de bebidas lácteas fermentadas comerciais e caracterizadas por Reis (2008). As culturas selecionadas para o teste *in vitro* foram aquelas que se mostraram resistentes ao dobro da concentração dos conservantes permitidos pela legislação vigente, ou seja, 0,4 % de benzoato de sódio e 0,4 % de sorbato de potássio, totalizando 15 culturas, das 74 isoladas.

As diferentes espécies foram estocadas em tubos de ensaio contendo 7,0 mL de meio Gymp (2,0 % de glicose, 0,5 % de extrato de levedura, 1,0 % de extrato de malte, 0,2 % de fosfato de sódio monobásico e 2,0 % de ágar), e posteriormente, cobertas com óleo mineral estéril para evitar ressecamento, sendo mantidas a  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para sua ativação, os leveduriformes foram semeados em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de meio para levedura (MPL - 2,0 % de glicose, 0,5 %

de extrato de levedura, 1,0 % de cloreto de sódio, 0,23 % de fosfato de sódio monobásico e 0,5 % de sulfato de amônio) e incubados a 25°C por 120 horas (REIS, 2008).

### 2.2.1 - Viabilidade das culturas leveduriformes

Em testes preliminares, após sua ativação, foi feita a determinação da densidade populacional dos leveduriformes, empregando-se o método de contagem em placa, em duplicata. Foram feitas diluições decimais seriadas até  $10^{-10}$ , em água peptonada estéril a 0,1 %, inoculadas por profundidade em ágar MPL e incubadas a 25°C com leituras após 12, 24, 36, 48 e 120 horas, de acordo com Mufandaedza e colaboradores (2006). Esse teste teve por objetivo, verificar qual o tempo de incubação necessário para atingir  $10^4$  UFC/mL de leveduriformes, para posterior análise do comportamento antimicrobiano *in vitro*. A densidade populacional foi definida a partir da média dos valores, < 1 a  $3,7 \times 10^9$  UFC/mL, obtidos por Reis (2008).

A fim de se obter o inóculo desejado, após a contagem em placa, uma colônia de cada espécie leveduriforme foi isolada e semeada em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de caldo MPL e, incubada pelo tempo necessário para atingir  $10^4$  UFC/mL. Após a incubação, foi confirmada a viabilidade dos micro-organismos, utilizando o método por profundidade e em duplicata, em ágar MPL, e incubação a 25°C por 5 dias.

### 2.3 - Planejamento dos experimentos

Para o estudo da capacidade antimicrobiana *in vitro* foram utilizadas quinze (15) culturas de fungos leveduriformes e três (3) culturas probióticas, em diferentes tratamentos: (1) diferentes densidades populacionais probióticas, (2) o sobrenadante livre de células (SLC) e o sobrenadante livre de células concentrado (SLCC). Os tratamentos foram feitos em duplicata, totalizando 180 experimentos, conforme a Figura 1.

| Culturas de leveduriformes (15)                                                                                               | X | Culturas probióticas (3)                                                         | X | Tratamentos (2)                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------|
| - <i>D. hansenii</i> var. <i>fabryii</i> (12)<br>- <i>C. edax</i> (1)<br>- <i>C. albidus</i> (1)<br>- <i>C. laurentii</i> (1) |   | - <i>B. animalis</i> (1)<br>- <i>L. acidophilus</i> (1)<br>- <i>L. casei</i> (1) |   | - Diferentes densidades populacionais de probióticos (1)<br>- SLC e SLCC (1) |

**Figura 1** - Planejamento experimental para o estudo do comportamento antimicrobiano *in vitro*, em duplicata.

## 2.4 - Comportamento antagonista *in vitro*

A fim de se trabalhar diretamente com os metabólitos sintetizados pelos cultivos probióticos, o sobrenadante livre de células (SLC) e o sobrenadante livre de células concentrado (SLCC) foram inoculados pelo método de perfuração e difusão em ágar, assim como as células em diferentes densidades populacionais, segundo Schillinger e Lücke (1989).

Foram feitos dois tratamentos, nos quais  $10^4$  UFC/mL de cada um dos cultivos de leveduriformes foram inoculados, por profundidade, em ágar MPL. Após solidificação, as placas foram incubadas a 25°C por 24 horas. Após a incubação, as placas foram divididas em quatro quadrantes, nos quais foi realizada uma perfuração (“poço”) de 9,0 mm de diâmetro.

Em cada uma das perfurações foram inoculadas, separadamente, alíquotas de 400,0 µL dos cultivos com diferentes densidades populacionais de células probióticas, do SLC e do SLCC, conforme ilustrado na Tabela 1, segundo Paula (2010).

**Tabela 1** - Tratamentos *in vitro* para avaliação da capacidade antimicrobiana.

| Quadrantes | Tratamento 1     | Tratamento 2 |
|------------|------------------|--------------|
| 1          | $10^6$ UFC/mL    | SLC          |
| 2          | $10^8$ UFC/mL    | SLC          |
| 3          | $10^{10}$ UFC/mL | SLCC         |
| 4          | $10^{12}$ UFC/mL | SLCC         |

**Legenda:** SLC = sobrenadante livre de células; SLCC = sobrenadante livre de células concentrado.

Em seguida, as placas foram incubadas à aproximadamente 7°C por 24 horas, para a completa difusão dos inóculos no ágar. Esse procedimento foi empregado para todas as culturas leveduriformes de modo a interagir, positiva ou negativamente, com as diferentes concentrações de cada uma das culturas probióticas.

As placas dos tratamentos com as diferentes densidades populacionais de células probióticas foram incubadas a 37°C, sob anaerobiose, com leituras de 24, 48 e 72 horas. Em paralelo, as placas contendo os SLC e SLCC foram incubadas à temperatura de 25°C por 24 e 48 horas.

## **2.5 - Comportamento antagonista *in situ***

Os fungos leveduriformes sensíveis à ação das bactérias probióticas no estudo *in vitro* foram selecionados para avaliação do comportamento antagonista *in situ*, ou seja, diretamente na bebida láctea fermentada.

Para o teste no produto foram realizados cinco processamentos: bebidas lácteas fermentadas pelos probióticos Bb-12, La-5 e Lc-1 e inoculadas com *C. albidus*; e bebidas lácteas fermentadas com Lc-1 e Bb-12 e inoculadas com *C. laurentii*.

### **2.5.1 - Preparação da bebida láctea fermentada**

Em cada processamento as bebidas lácteas foram preparadas, utilizando-se leite integral em pó (70,0 %) e soro de leite em pó (30,0 %) para compor aproximadamente 10,0 % de sólidos totais. Os ingredientes foram pesados e misturados na forma seca e reconstituídos em água a 60°C, em quantidade suficiente para preparar cerca de 400,0 mL de bebida láctea. Essa mistura foi submetida à esterilização a 121°C por 15 minutos, seguida de resfriamento a 42°C. À mistura de leite e soro foi adicionada 0,10% de cultura láctica probiótica ( $10^{10}$  UFC/mL) e o inóculo do cultivo leveduriforme de  $10^4$  UFC/mL, em condições assépticas (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008, com adaptações). Foram preparados processamentos controle, sem a adição da cultura leveduriforme. O produto foi incubado a 43°C em banho termostatizado. O tempo de fermentação da bebida láctea foi calculado a partir do início da

inoculação, até obter-se o valor de pH próximo a 4,6. Foi feito um controle e registro do pH durante toda a fermentação para o cálculo da cinética de acidificação do meio. Terminada a fermentação, o produto foi resfriado inicialmente a 20°C, seguida de quebra do coágulo por agitação manual durante 2 minutos, de forma padronizada para todos os experimentos, e resfriado a 5°C. O produto foi embalado em frascos estéreis com capacidade para 50,0 mL e armazenado a 5°C para posterior análise (Figura 2).

## **2.5.2 - Avaliação da bebida láctea fermentada**

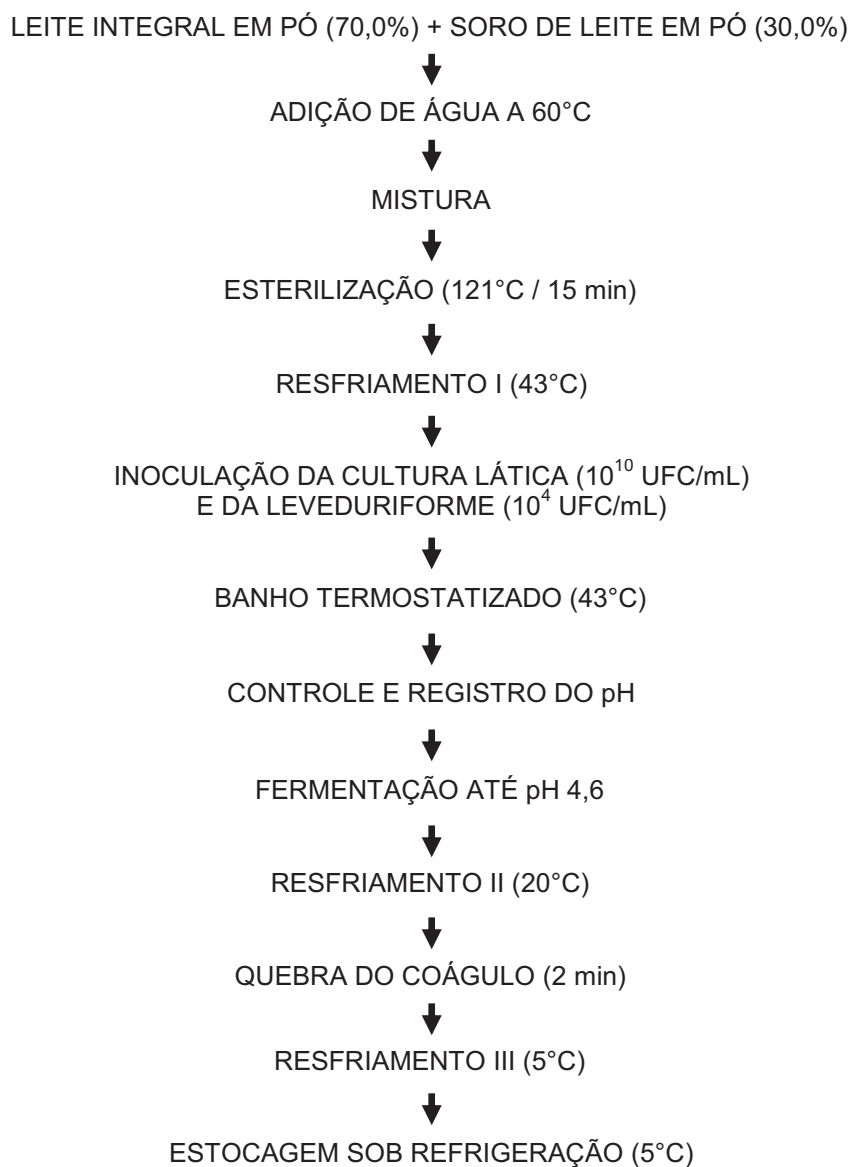
### **2.5.2.1 - Análises físico-químicas**

As bebidas lácteas foram submetidas às análises físico-químicas, em triplicata. O teor de sólidos totais foi determinado por meio da secagem da amostra em estufa a vácuo, a 70°C por 24 horas (CASE; BRADLEY JR; WILLIAMS, 1985). Durante a fermentação das bebidas lácteas foram feitos os registros dos valores de pH e do tempo de fermentação até atingir o pH de aproximadamente 4,6, utilizando-se um potenciômetro digital acoplado a um registrador portátil (INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL, 2008). A determinação da acidez titulável foi realizada por meio de titulação ácido-alcalimétrica, usando-se fenolftaleína como indicador. Os teores de acidez obtidos foram expressos em graus Dornic (°D) (IAL, 2008).

### **2.5.2.2 - Análises microbiológicas**

A avaliação da viabilidade dos micro-organismos nas amostras de bebidas lácteas preparadas foi feita a partir de diluições decimais seriadas. Dez mililitros da amostra foram transferidos de forma asséptica para um frasco de Erlenmeyer estéril contendo 90,0 mL de água peptonada 0,1%. Essa diluição foi agitada vigorosamente e, em seguida, foram feitas as diluições decimais seriadas utilizando-se o mesmo diluente e inoculações por profundidade em meios seletivos para a contagem dos micro-organismos: Bb-12 - ágar MRS-IM com glicose, adicionado de solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína, a 37°C por 72 horas, sob anaerobiose; La-5 - ágar MRS com

maltose, a 37°C por 72 horas, sob aerobiose; Lc-1 - ágar MRS acidificado (pH 5,4), a 37°C por 72 horas, sob anaerobiose (IDF, 1995; 1997), e para os fungos leveduriformes foram utilizadas placas de Compact Dry® YM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), incubadas a 25°C por 120 horas.



**Figura 2** - Fluxograma do processo de fabricação de bebidas lácteas fermentadas.

### **2.5.3 - Avaliação da bebida láctea fermentada durante a vida de prateleira**

O comportamento de pós-acidificação (pH e acidez titulável) e a viabilidade da microbiota, citadas nos itens 2.5.2.1 e 2.5.2.2 foram avaliados no produto recém processado, com 20, 40 e 60 dias, para verificar possíveis alterações durante a estocagem refrigerada a 5°C.

Neste estudo, foi estabelecido o período de 60 dias de estocagem devido ao prazo de vida útil informado nos rótulos das bebidas lácteas fermentadas comerciais variar entre 45 e 60 dias.

### **2.6 - Análise estatística dos resultados experimentais**

Foi feita a análise da variância (ANOVA) da avaliação físico-química das bebidas lácteas fermentadas. A comparação entre as médias foi feita pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância  $p > 0,05$ , utilizando-se o programa computacional Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

## **3 - Resultados e discussão**

### **3.1 - Comportamento *in vitro* dos cultivos probióticos sobre os leveduriformes**

#### **3.1.1 - Diferentes densidades populacionais das culturas probióticas**

No tratamento 1 foi avaliado o comportamento de diferentes densidades populacionais de Bb-12, La-5 e Lc-1 sobre os micro-organismos leveduriformes. Nenhum dos inóculos dos probióticos testados ( $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$  e  $10^{12}$  UFC/mL) apresentou antagonismo sobre os cultivos leveduriformes (Figura 3).

As células bacterianas freqüentemente comunicam-se por meio de mecanismos de sensor de quorum, que envolvem informações sobre a densidade populacional e o reconhecimento, dependente de um auto-indutor excretado no meio ambiente, seguido por mudanças na expressão gênica

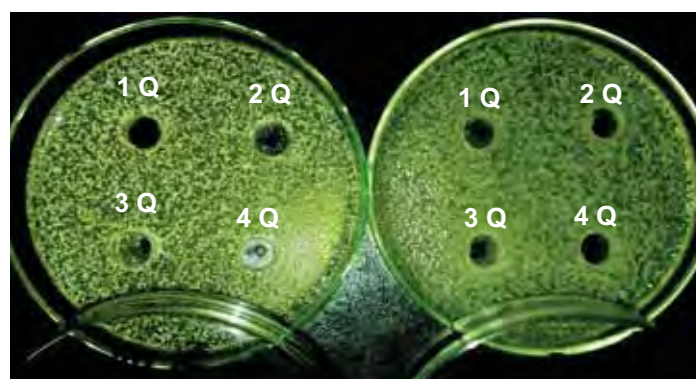
(BUCK; AZCARATE-PERIL; KLAENHAMMER, 2009; KIM et al., 2008). Algumas bactérias Gram-positivas de mesma espécie respondem a sinais captados no meio, como por exemplo, a síntese de bacteriocinas. Na medida em que a densidade populacional aumenta, a quantidade desses compostos liberados também aumenta, podendo promover um efeito desejável ou não em espécies diferentes (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Sendo assim, as células probióticas de Bb-12, La-5 e Lc-1, nas densidades populacionais testadas, não foram capazes de liberar compostos inibidores em concentrações suficientes, que pudessem resultar no efeito antagonista. A competição por nutrientes ou a temperatura, empregada para a completa difusão do inóculo no ágar (7°C por 24 horas), pode ter influenciado no desenvolvimento da cultura probiótica, ou ainda a difusão dos compostos antimicrobianos no ágar pode ter afetado a formação de halos de inibição.

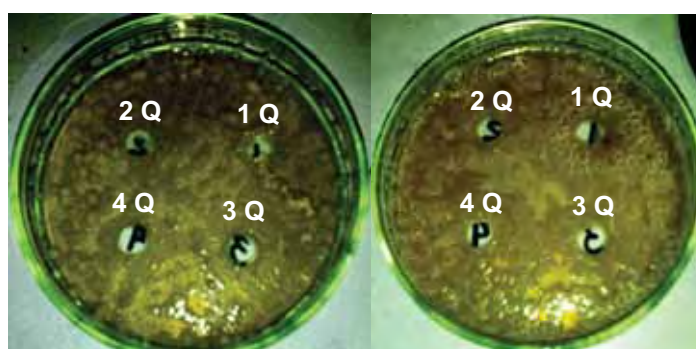
A literatura relata vários estudos da ação antagonista de *Bifidobacterium* spp. sobre micro-organismos patógenos, tais como, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* Typhimurium, *H. pylori* e *C. coli* (COLLADO; HERNÁNDEZ; SANZ, 2005; SANZ; COLLADO; DALMAU, 2006), porém, dados referentes a ação sobre fungos leveduriformes são escassos.

Apesar dos resultados deste estudo comprovarem que não houve comportamento antagonista entre os diferentes micro-organismos. De Muynck e colaboradores (2004), ao utilizarem o teste de difusão em ágar com diferentes cepas de bactérias acidoláticas sobre fungos deteriorantes, constatou que 13 das 18 (75,0 %) culturas utilizadas apresentaram alguma atividade antifúngica. Dentre essas, *L. acidophilus* LMG 9433, *L. amylovorus* DSM 20532, *L. brevis* LMG 6906 e *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* LMG 9196 mostraram ser excelentes produtoras de metabólitos antifúngicos, não somente pelo efeito de redução do pH, como também pela produção de outros metabólitos orgânicos.

a)



b)



c)



**Legenda:** 1Q =  $10^6$  UFC/mL; 2Q =  $10^8$  UFC/mL, 3Q =  $10^{10}$  UFC/mL e 4Q =  $10^{12}$  UFC/mL.

**Figura 3** - Ensaio com diferentes densidades populacionais da cultura probiótica sobre *Candida edax*. a) Bb-12, b) La-5, c) Lc-1.

Também são raros os estudos sobre a atividade antagonista de cepas do grupo do *L. casei* sobre fungos leveduriformes.

Voulgari e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antifúngica de 81 cepas de bactérias acidoláticas isoladas da superfície de queijos duros. As cepas probióticas: *Enterococcus hirae*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *Leuconostoc* sp. inibiram o *Penicillium* sp. M1, enquanto os fungos *Penicillium* sp. MT1, *D. hansenii* e *P. candidum* foram inibidos por todas as

culturas acidoláticas, exceto por *L. bulgaricus*. A substância extracelular com efeito antimicrobiano foi sensível às enzimas proteolíticas, sugerindo que o efeito inibidor foi provavelmente devido à presença de bacteriocina. Neste estudo, a cultura de Lc-1 não produziu substância antimicrobiana capaz de inibir *Debaryomyces hansenii* e *Candida edax*.

### 3.1.2 - Sobrenadante livre de células (SLC) e sobrenadante livre de células concentrado (SLCC) das culturas probióticas

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos, em milímetros, a partir da formação dos halos de inibição dos leveduriformes testados, na presença das culturas probióticas Bb-12, La-5 e Lc-1.

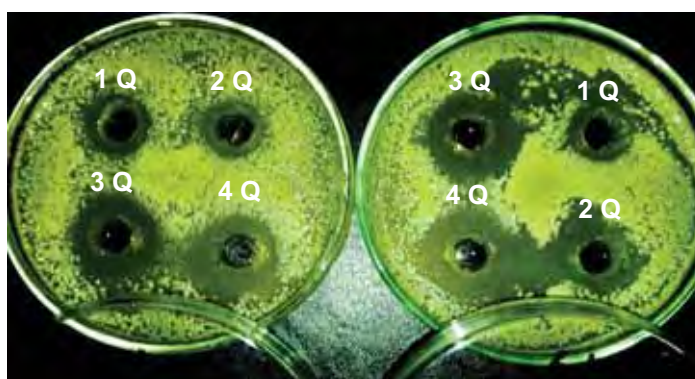
**Tabela 2** - Atividade antimicrobiana de bactérias probióticas sobre fungos leveduriformes. Valores dos halos de inibição em mm.

| Fungos<br>leveduriformes                         | Culturas probióticas |           |           |           |           |            |
|--------------------------------------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                                                  | Bb-12                |           | La-5      |           | Lc-1      |            |
|                                                  | SLC                  | SLCC      | SLC       | SLCC      | SLC       | SLCC       |
| <i>Cryptococcus albidus</i>                      | 3,8 - 4,2            | 6,5 - 8,5 | 2,9 - 3,1 | 6,9 - 7,4 | 5,8 - 6,2 | 9,5 - 11,0 |
| <i>Cryptococcus laurentii</i>                    | 2,5 - 3,2            | 3,0 - 4,8 | -         | -         | 2,5 - 4,0 | 6,7 - 8,5  |
| <i>Candida edax</i>                              | -                    | -         | -         | -         | -         | -          |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i> | -                    | -         | -         | -         | -         | -          |

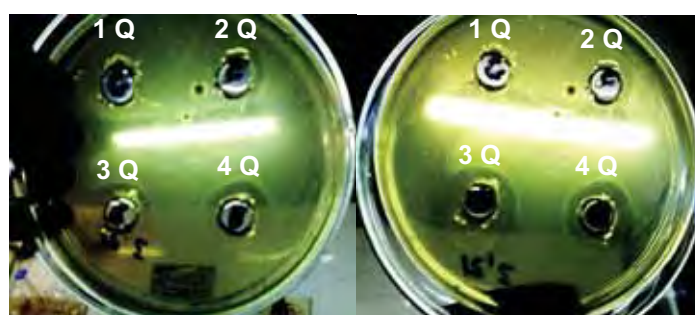
Houve a formação de halos de inibição de *Cryptococcus albidus* e de *Cryptococcus laurentii*, pelo SLC (Quadrantes 1 e 2) e o SLCC (Quadrantes 3 e 4) de *Bifidobacterium animalis*, como ilustra a Figura 4.

Apesar dos diferentes inóculos se difundirem de modo similar no ágar, a concentração do sobrenadante influenciou de modo visível os resultados, mostrando que o efeito inibidor foi potencializado após ser concentrado. Além disso, os metabólitos presentes no SLCC não foram sensíveis ao aquecimento e ao tempo de exposição no evaporador rotativo, a 55°C durante 30 minutos.

a)



b)



**Legenda:** 1Q e 2Q = SLC, 3Q e 4Q = SLCC.

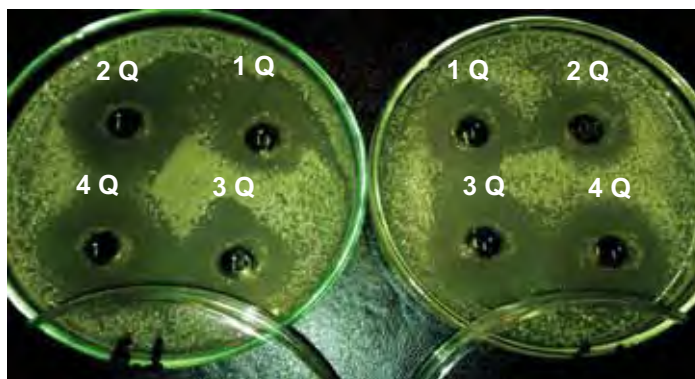
**Figura 4** - Ensaio com o SLC e o SLCC da cultura probiótica Bb-12 sobre os fungos leveduriformes. a) *Cryptococcus albidus*, b) *Cryptococcus laurentii*.

A inibição dos cultivos de *C. albidus* e *C. laurentii* se deve possivelmente à ação dos metabólitos liberados pelas culturas de Bb-12. Esse probiótico é capaz de produzir uma série de substâncias de caráter antimicrobiano, tais como os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico. Alguns estudos relatam que *B. animalis* NCFB 1454 é capaz de sintetizar bacteriocinas ou peptídios antimicrobianos de amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes, incluindo *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. enterica* Typhimurium, *H. pylori* e *Campylobacter coli* (COLLADO; HERNÁNDEZ; SANZ, 2005; SANZ; COLLADO; DALMAU, 2006).

Os compostos secretados pela cultura La-5 apresentaram atividade antagonista somente para *Cryptococcus albidus*, com a formação de halos de inibição para o SLC e o SLCC, como observado na Figura 5.

Os diâmetros dos halos de inibição foram menores no sobrenadante livre de células, quando comparado ao concentrado. Assim como nos ensaios com os sobrenadantes livres de células de Bb-12, a concentração do

sobrenadante de La-5 influenciou nos resultados mostrando que o efeito inibidor foi potencializado após ser concentrado. Além disso, o SLCC não foi sensível ao aquecimento pelo tempo de exposição, de 55°C durante 30 minutos.

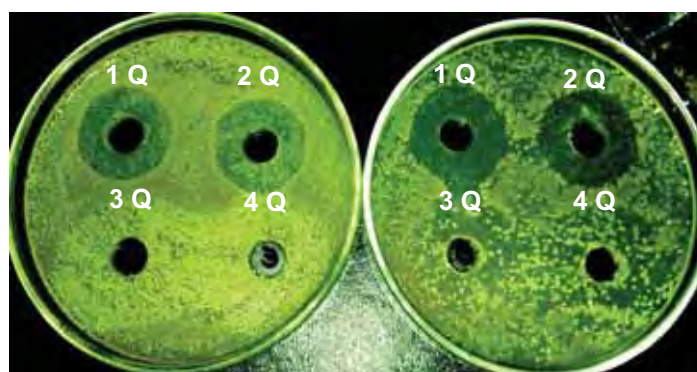


**Legenda:** 1Q e 2Q = SLC, 3Q e 4Q = SLCC.

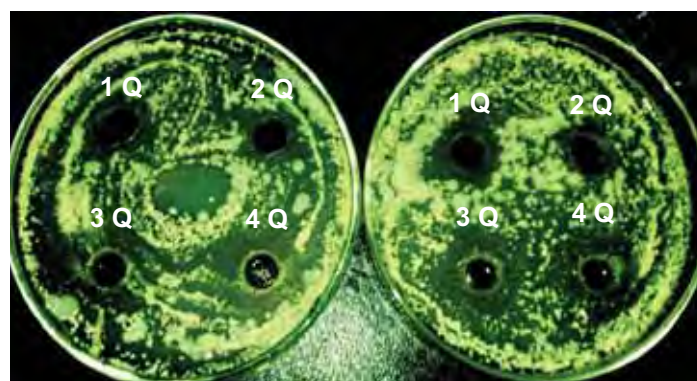
**Figura 5** - Ensaio com o SLC e o SLCC da cultura probiótica La-5 sobre *Cryptococcus albidus*.

Alguns autores têm se dedicado a estudar a produção e ação de compostos antimicrobianos por culturas probióticas. Pereira e Gómez (2007) estudaram a natureza do composto inibidor produzido pela cepa *Lactobacillus acidophilus* La-5. A atividade antimicrobiana exercida por este micro-organismo sobre *E. coli* e *S. aureus* foi provavelmente devido à presença do ácido láctico e do baixo pH. Kos e colaboradores (2008) selecionaram culturas probióticas com potenciais para produção de substâncias antimicrobianas: *Enterococcus faecium* L3, *L. plantarum* L4 e *L. acidophilus* M92. Nos estudos *in vitro*, utilizando o método de difusão em ágar, foi constatado que esses micro-organismos apresentaram efeito antimicrobiano sobre *S. enterica* Typhimurium e *L. monocytogenes*. Em estudos realizados por Mishra e Prasad (2005), também foi constatada a presença de atividade inibidora *in vitro* de diferentes culturas de *L. casei* sobre micro-organismos patogênicos, como *Salmonella typhi*, *Salmonella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus*.

a)



b)



**Legenda:** 1Q e 2Q = SLC, 3Q e 4Q = SLCC.

**Figura 6** - Ensaio com o SLC e o SLCC da cultura probiótica Lc-1 sobre os fungos leveduriformes. a) *Cryptococcus albidus*, b) *Cryptococcus laurentii*.

Os metabólitos produzidos pela cultura probiótica Lc-1 apresentaram ação antagonista sobre *C. albidus* e *C. laurentii*, de acordo com a Figura 6. A diferença no diâmetro dos halos pode ocorrer, pois a inibição de um micro-organismo depende do grau de sensibilidade e da concentração da substância inibidora presente (ATANASSOVA et al., 2003). Provavelmente, *C. albidus* apresenta maior sensibilidade aos compostos orgânicos produzidos por Lc-1, do que *C. laurentii*.

### 3.1.2.1 - Interação positiva com culturas de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*

Nos ensaios realizados com o SLC e o SLCC das culturas probióticas de Bb-12, La-5 e de Lc-1, houve a formação de um intenso halo de desenvolvimento, de coloração creme, na presença dos metabólitos produzidos

pelos probióticos, com todas as culturas de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, como exemplifica a Figura 7.

Entretanto, não se pode afirmar que esta interação seja resultado de uma relação de protocooperação, pois não há a presença de células probióticas para se estabelecer uma relação microbiana. A formação desses halos pode ser justificada devido à presença de metabólitos de origem bacteriana (como fontes de carbono, por exemplo). Com a lise celular, estes metabólitos são liberados para o meio e, posteriormente, com a centrifugação e a concentração do sobrenadante, eles poderiam ser assimilados mais facilmente pelos cultivos de *D. hansenii* var. *fabryii*, fazendo com que estes micro-organismos apresentassem um desenvolvimento mais acentuado ao redor das perfurações. Portanto, pelo tipo de tratamento aplicado, pode-se dizer que houve uma interação positiva entre os metabólitos produzidos pelos probióticos e todos os cultivos de *D. hansenii* var. *fabryii*.

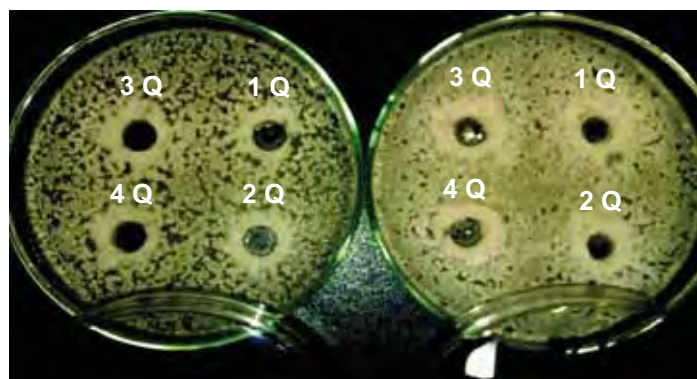
Ao contrário dos outros fungos leveduriformes em estudo, a expressão de diferentes proteases extracelulares produzidas por *D. hansenii* pode protegê-las dos compostos antimicrobianos produzidos pelas culturas acidoláticas, porém os mecanismos de ação ainda não são muito conhecidos (BREUER; HARMS, 2006).

Estudos mostram que *D. hansenii* é capaz de inibir o desenvolvimento de certos micro-organismos patogênicos e deteriorantes, além de contribuir com intensa atividade proteolítica e lipolítica e desenvolvimento de aroma e textura de certos tipos de queijos (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996; ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008; LIU; TSAO, 2009).

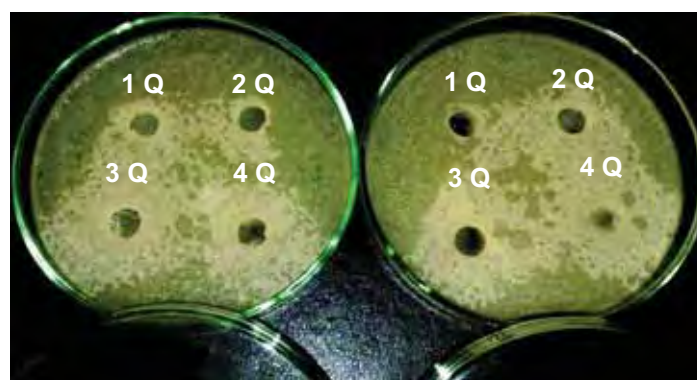
Os fungos leveduriformes *Candida edax*, *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* não apresentaram interação positiva com os compostos produzidos pelas culturas probióticas. Esses fungos leveduriformes são relacionados a vários tipos de doenças, as quais acometem principalmente pacientes hospitalizados e imunodeprimidos. Além disso, não foram encontrados estudos relacionados à interação positiva desses leveduriformes com as BAL presentes em produtos lácteos fermentados (JACQUES; CASAREGOLA, 2006; PAULA, 2010), sendo esta interação ainda pouco compreendida. Acredita-se que exista uma relação específica entre os micro-organismos que fazem parte de uma biota, resultando em inibição ou interação

(WOUTERS et al., 2002; FERREIRA; VILJOEN, 2003; ÁLVAREZ-MARTIN et al., 2008).

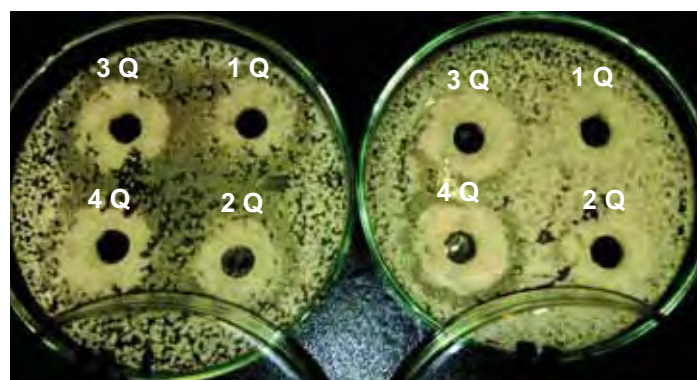
a)



b)



c)



**Legenda:** 1Q e 2Q = SLC, 3Q e 4Q = SLCC.

**Figura 7** - Formação de halos de interação positiva, representando o intenso desenvolvimento de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* na presença do SLC e do SLCC. a) Bb-12, b) La-5 e c) Lc-1.

Um exemplo de efeito sinérgico positivo é a ação de alguns fungos leveduriformes na maturação de certos tipos de queijos e em alguns produtos

lácteos. As bactérias acidoláticas produzem ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o cítrico. Em resposta, os leveduriformes assimilam esses ácidos, produzindo álcool e gás carbônico, aumentando os valores de pH, favorecendo o desenvolvimento de outras bactérias na superfície do queijo, como *Brevibacterium linens*. Além disso, os fungos leveduriformes ao metabolizarem o ácido láctico liberam vitaminas, tais como, as do complexo B, ácido pantotênico, niacina, riboflavina e biotina, as quais são importantes para o desenvolvimento das bactérias acidoláticas. Os leveduriformes produzem também outros metabólitos, como proteases, lipases (liberando ácidos graxos de cadeia curta) e outros compostos importantes para o desenvolvimento de aroma no queijo, como o etanol, acetaldeído, etilacetato e etilbutirato (WELTHAGEN; VILJOEN, 1998; VILJOEN et al., 2001; BREUER; HARMS, 2006; ÁLVAREZ-MARTIN et al., 2008).

A interação também pode ser positiva entre os fungos leveduriformes com as bactérias, resultando em aumento da viabilidade. Lourens-Hattingh e Viljoen e colaboradores (2001) inocularam no processamento de iogurtes probióticos, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* e *Issatchenkia orientalis*. *D. hansenii* e *Y. lipolytica* foram capazes de controlar o pH do iogurte durante todo o período de estocagem, prevenindo o excesso de pós-acidificação, além de assegurar a viabilidade das culturas probióticas do produto durante a vida de prateleira do produto.

Liu e Tsao (2009) verificaram que cinco espécies de fungos leveduriformes (*Saccharomyces bayanus*, *Williopsis saturnus* var. *saturnus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida Kefir* e *Kluyveromyces marxianus*) aumentaram a viabilidade de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em uma cultura mista de iogurte. *Williopsis saturnus* var. *saturnus* também aumentou a viabilidade de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. reuteri*, mas falhou em manter a viabilidade de *L. johnsonii*, *Streptococcus thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Os resultados obtidos nesta etapa do estudo permitiram selecionar os micro-organismos que seriam utilizados nos testes *in situ*: processamento de bebidas lácteas fermentadas por Bb-12, La-5 e Lc-1 inoculadas com *C. albidus* e bebidas lácteas fermentadas por Lc-1 e Bb-12, inoculadas com *C. laurentii*.

### 3.2 - Comportamento *in situ* dos cultivos probióticos sobre os fungos leveduriformes

#### 3.2.1 - Caracterização físico-química

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados obtidos para as análises realizadas com as bebidas lácteas fermentadas por Bb-12, La-5 e Lc-1, respectivamente, durante 1, 20, 40 e 60 dias de estocagem avaliados.

As bebidas fermentadas por Bb-12 apresentaram os menores valores para o teor de sólidos totais, entre os tratamentos controle e *C. albidus* ou *C. laurentii* (Tabela 3). A análise de variância indica que o teor de sólidos totais do tratamento controle foi estatisticamente igual ao do *C. albidus* ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3** - Características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Bb-12.

|                             | Período de estocagem (dias) | Controle                     | Bb-12 + <i>C. albidus</i> <sup>1</sup> | Bb-12 + <i>C. laurentii</i> <sup>2</sup> |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Sólidos Totais (%)</b>   | 1                           | 8,72 <sup>A</sup> ±0,10      | 8,53 <sup>A</sup> ±1,60                | 7,31 <sup>A</sup> ±0,16                  |
| <b>Acidez (°D)</b>          | 1                           | 33,46 <sup>aA</sup> ±0,05    | 34,81 <sup>cA</sup> ±2,68              | 38,67 <sup>cA</sup> ±1,41                |
|                             | 20                          | 36,68 <sup>aB</sup> ±0,05    | 47,80 <sup>aA</sup> ±0,50              | 48,31 <sup>bA</sup> ±1,41                |
|                             | 40                          | 36,80 <sup>aC</sup> ±0,05    | 43,75 <sup>abB</sup> ±1,05             | 54,60 <sup>aA</sup> ±2,84                |
|                             | 60                          | 38,09 <sup>aB</sup> ±0,59    | 40,92 <sup>bcB</sup> ±0,41             | 59,63 <sup>aA</sup> ±2,86                |
| <b>pH</b>                   | 1                           | 4,65 <sup>cA</sup> ±0,01     | 4,63 <sup>dA</sup> ±0,01               | 4,67 <sup>aA</sup> ±0,02                 |
|                             | 20                          | 5,45 <sup>bB</sup> ±0,04     | 5,60 <sup>aA</sup> ±0,11               | 4,58 <sup>aC</sup> ±0,03                 |
|                             | 40                          | 5,54 <sup>bA</sup> ±0,01     | 5,21 <sup>bB</sup> ±0,04               | 4,40 <sup>bC</sup> ±0,11                 |
|                             | 60                          | 5,73 <sup>aA</sup> ±0,01     | 4,90 <sup>cB</sup> ±0,08               | 4,32 <sup>bC</sup> ±0,05                 |
| <b>Tempo de fermentação</b> | 1                           | 38h 40m <sup>B</sup> ±42,43m | 43h 20m <sup>A</sup> ±42,43m           | 43h 40m <sup>A</sup> ±28,28m             |

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata, exceto para o tempo de fermentação que foi feito em duplicata.

<sup>a, b, c</sup> Letras iguais para a mesma coluna ou <sup>A, B</sup> Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Cultura 6,1, <sup>2</sup>Cultura 12,2

1 dia = produto recém processado

**Tabela 4** - Características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas pela cultura La-5.

|                             | Período de estocagem (dias) | Controle                     | La-5 + <i>C. albidus</i> <sup>1</sup> |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Sólidos Totais (%)</b>   | 1                           | 8,92 <sup>B</sup> ±0,16      | 9,15 <sup>A</sup> ±0,09               |
| <b>Acidez (°D)</b>          | 1                           | 30,86 <sup>CB</sup> ±0,35    | 35,44 <sup>BA</sup> ±0,63             |
|                             | 20                          | 31,40 <sup>BB</sup> ±0,43    | 41,06 <sup>AA</sup> ±0,39             |
|                             | 40                          | 40,43 <sup>AA</sup> ±0,47    | 43,22 <sup>AA</sup> ±0,49             |
|                             | 60                          | 41,07 <sup>AA</sup> ±0,37    | 43,83 <sup>AA</sup> ±0,59             |
| <b>pH</b>                   | 1                           | 4,62 <sup>BA</sup> ±0,01     | 4,67 <sup>BA</sup> ±0,02              |
|                             | 20                          | -                            | -                                     |
|                             | 40                          | -                            | -                                     |
|                             | 60                          | -                            | -                                     |
| <b>Tempo de fermentação</b> | 1                           | 19h 50m <sup>b</sup> ±14,14m | 41h 40m <sup>a</sup> ±41,42           |

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata, exceto para o tempo de fermentação que foi feito em duplicata.

<sup>a, b, c</sup> Letras iguais para a mesma coluna ou <sup>A, B</sup> Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa (p>0,05).

<sup>1</sup>Cultura 6,1

(-) Perda dos resultados

1 dia = produto recém processado

**Tabela 5** - Características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Lc-1.

|                             | Período de estocagem (dias) | Controle                    | Lc-1 + <i>C. albidus</i> <sup>1</sup> | Lc-1 + <i>C. laurentii</i> <sup>2</sup> |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Sólidos Totais (%)</b>   | 1                           | 8,92 <sup>B</sup> ±0,16     | 9,15 <sup>A</sup> ±0,09               | 8,94 <sup>AB</sup> ±0,21                |
| <b>Acidez (°D)</b>          | 1                           | 31,51 <sup>CB</sup> ±0,84   | 35,98 <sup>CA</sup> ±0,13             | 38,16 <sup>DA</sup> ±0,9                |
|                             | 20                          | 46,24 <sup>AC</sup> ±0,26   | 48,47 <sup>BB</sup> ±0,86             | 56,80 <sup>CA</sup> ±0,66               |
|                             | 40                          | 44,81 <sup>abB</sup> ±0,86  | 74,04 <sup>AA</sup> ±1,21             | 77,40 <sup>BA</sup> ±2,47               |
|                             | 60                          | 41,66 <sup>BC</sup> ±0,87   | 70,43 <sup>AB</sup> ±1,94             | 89,10 <sup>AA</sup> ±1,70               |
| <b>pH</b>                   | 1                           | 4,65 <sup>AA</sup> ±0,04    | 4,65 <sup>AA</sup> ±0,03              | 4,62 <sup>AA</sup> ±0,04                |
|                             | 20                          | 4,65 <sup>AB</sup> ±0,02    | 4,88 <sup>AA</sup> ±0,02              | 4,44 <sup>abC</sup> ±0,06               |
|                             | 40                          | 4,64 <sup>AA</sup> ±0,44    | 4,49 <sup>AA</sup> ±0,22              | 4,20 <sup>bcA</sup> ±0,07               |
|                             | 60                          | 4,91 <sup>AA</sup> ±0,02    | 4,28 <sup>AB</sup> ±0,22              | 4,07 <sup>CB</sup> ±0,09                |
| <b>Tempo de fermentação</b> | 1                           | 8h 45m <sup>c</sup> ±21,21m | 17h 25m <sup>b</sup> ±77,78m          | 150h 50m <sup>a</sup> ±70,02m           |

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata, exceto para o tempo de fermentação que foi feito em duplicata.

<sup>a, b, c</sup> Letras iguais para a mesma coluna ou <sup>A, B</sup> Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa (p>0,05).

<sup>1</sup>Cultura 6,1, <sup>2</sup>Cultura 12,2

1 dia = produto recém processado

As bebidas lácteas fermentadas por La-5 apresentaram teores de sólidos totais variando de 8,92 % e 9,15 %, para a bebida controle e para

fermentada com La-5 na presença de *Cryptococcus albidus*, respectivamente (Tabela 4). Apesar da análise de variância do teor de sólidos totais indicar que, os tratamentos realizados foram estatisticamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ), para a cultura probiótica La-5, assim como para as bebidas fermentadas por Lc-1 (Tabela 5), estas diferenças de sólidos totais são consideradas normais em processos industriais de fabricação de bebidas lácteas.

O teor de sólidos é importante pelas suas propriedades físicas, como a consistência e a viscosidade e pelo valor nutritivo do produto, podendo variar de 9,0 % a 30,0 % nos leites fermentados (TAMIME; ROBINSON, 2007). Entretanto, o teor de sólidos totais não é de grande relevância para a produção de bebidas lácteas, por se tratarem de bebidas de baixa viscosidade. Esse parâmetro depende da formulação utilizada; quanto maior a porcentagem de sólidos dos ingredientes usados para o preparo das bebidas lácteas, maior será o teor de sólidos totais (THAMER; PENNA, 2006).

Outros autores obtiveram resultados superiores àqueles encontrados neste estudo. Madureira (2004) produziu bebida láctea fermentada, variando as concentrações de soro de queijo, sacarose e oligofrutose, fermentada por uma cultura láctea mista contendo *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., resultando em 14,37 % e 17,75 % de sólidos totais. Gomes (2005) utilizou a mesma cultura mista para a produção de bebidas lácteas com diferentes concentrações de soro de leite em pó, leite em pó desnatado e isolado protéico de soja, e obteve teores de sólidos totais entre 13,27 % e 18,46 %. Lima (2003) desenvolveu uma bebida láctea à base de soro de queijo, fortificada com ferro e encontrou valores de sólidos totais que variaram entre 18,12 % a 21,71 %. Thamer e Penna (2006) produziram bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos contendo de 15,68 % a 18,97 % de sólidos totais.

A pós-acidificação foi observada nas bebidas lácteas fermentadas por Bb-12, La-5 e Lc-1, durante toda a estocagem refrigerada (1, 20, 40 e 60 dias), e está apresentada nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente. As bebidas fermentadas pelas culturas probióticas apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na acidez titulável entre os tratamentos controle e os adicionados dos leveduriformes, nos diferentes períodos analisados.

A cultura probiótica La-5 utilizada neste estudo apresenta baixa capacidade de acidificação (ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004), podendo-se dizer que:  $Lc-1 > Bb-12 > La-5$ . Em função das características fisiológicas de Lc-1 (RAVULA; SHAH, 1998), a pós-acidificação das bebidas fermentadas por essa cultura foi superior àquelas observadas nas bebidas fermentadas por Bb-12 e La-5.

Os valores de acidez titulável das bebidas fermentadas por Bb-12, La-5 e Lc-1 foram superiores nos tratamentos adicionados dos leveduriformes (Tabelas 3, 4 e 5) quando comparado aos tratamentos controle. Houve diferença significativa dos valores de acidez entre os tratamentos e durante a estocagem refrigerada.

A presença de fungos leveduriformes não é desejada nas bebidas lácteas fermentadas, pois a deterioração pode ser decorrente da ação desses micro-organismos. Quando presentes promovem fermentação com excessiva formação de ácido (o que justifica o aumento da pós-acidificação significativa nas bebidas produzidas, adicionadas dos leveduriformes) e gás, resultando em sabores e odores desagradáveis, despigmentações, modificações na textura, formação de limo e sedimentos, deteriorando o produto, e conseqüentemente, comprometendo a sua vida de prateleira (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008; JACQUES; CASAREGOLA, 2008).

Diversos fatores tornam o ambiente de produção propício para o desenvolvimento de leveduriformes nos produtos lácteos, com destaque para, a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento, a má higienização dos equipamentos, do ambiente e dos manipuladores, a ineficiência da pasteurização, além de ingredientes contaminados, como polpas de frutas e mel (VILJOEN et al., 2001). Em virtude de sua contaminação, o produto caracteriza-se por um aroma e sabor ácidos atípicos (GUEDES NETO et al., 2003).

As bebidas adicionadas de *C. laurentii* apresentaram maiores valores de acidez quando comparadas àquelas adicionadas de *C. albidus*, provavelmente por diferenças na taxa de produção de ácido, resultando em diferenças no tempo de fermentação entre a cepa de *C. laurentii* e a *C. albidus*.

Apesar de constatada a ausência dos fungos leveduriformes durante os períodos de estocagem, provavelmente os seus metabólitos de origem ácida,

produzidos desde o momento da inoculação das culturas, justificam também o aumento dos valores de acidez nas bebidas lácteas acrescidas desses micro-organismos.

Durante o período de estocagem refrigerada a acidez aumentou lentamente, pois as culturas probióticas continuam viáveis durante o período útil do produto. As diferenças entre os valores de acidez nas bebidas produzidas e nos períodos de estocagem podem estar relacionadas ao tipo, à concentração, à atividade e ao poder de acidificação de cultura láctica utilizada, ao valor estabelecido para finalizar a fermentação, à quantidade de soro de leite utilizada na elaboração das bebidas lácteas, assim como ao longo do tempo de estocagem (CALDEIRA et al., 2010).

De maneira geral, houve diferença significativa nos valores de pH das bebidas lácteas fermentadas por Bb-12, ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, diferentemente do que se observou com relação às bebidas fermentadas por La-5 e Lc-1.

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) encontraram os menores valores de pH (4,19) e os maiores de acidez titulável (135,5°D) no leite fermentado por *Streptococcus thermophilus*, enquanto o leite fermentado por *Bifidobacterium longum* apresentou a menor acidez titulável (70,3°D) e o maior pH (5,06) aos 21 dias de estocagem, em estudo com leites fermentados por *S. thermophilus*, *B. longum* e *L. acidophilus*. Assim como neste estudo, os autores observaram maiores valores de pH nos produtos fermentados por *Bifidobacterium*, do que por outras culturas, em função das características intrínsecas desse gênero.

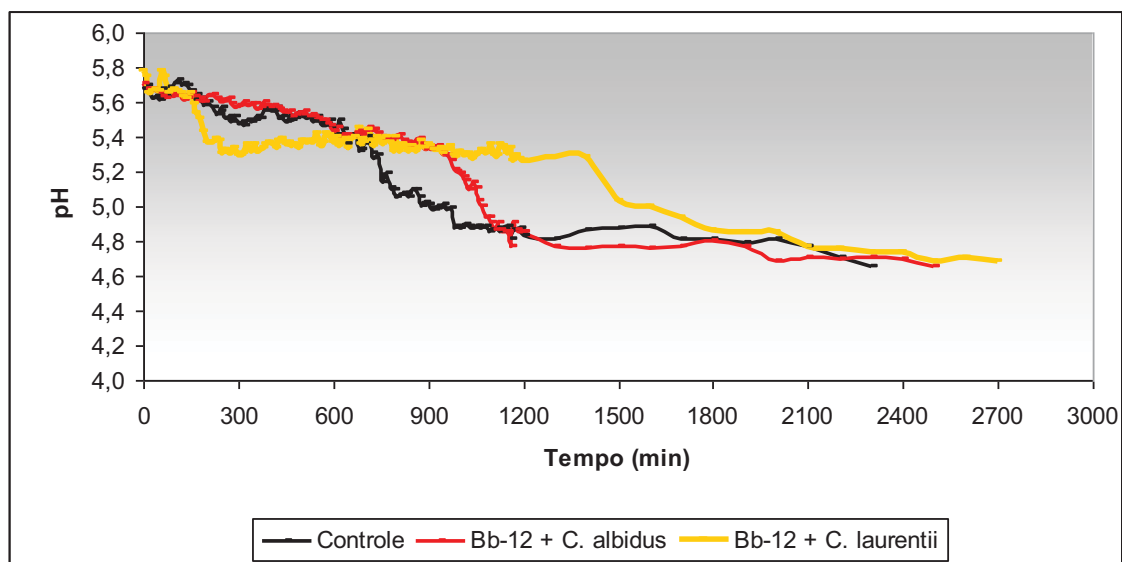
Gomes (2005) explica que o controle do pH é de suma importância para o processo de fermentação, pois a separação do soro (sinérese) está diretamente relacionada com este parâmetro, além de promover alterações na qualidade microbiológica e sensorial.

Nas bebidas lácteas funcionais desenvolvidas por Madureira (2004), Gomes (2005) e Thamer e Penna (2006), os valores de pH variaram de 4,60 a 4,89, 4,41 a 4,65 e 4,72 a 4,83, respectivamente. Brandão (2006) elaborou uma bebida láctea fermentada por *L. acidophilus* empregando diferentes concentrações de inulina. Foram encontrados valores iniciais de pH que variaram de 4,10 a 4,76. Após os períodos de estocagem (7, 14, 21 e 28 dias),

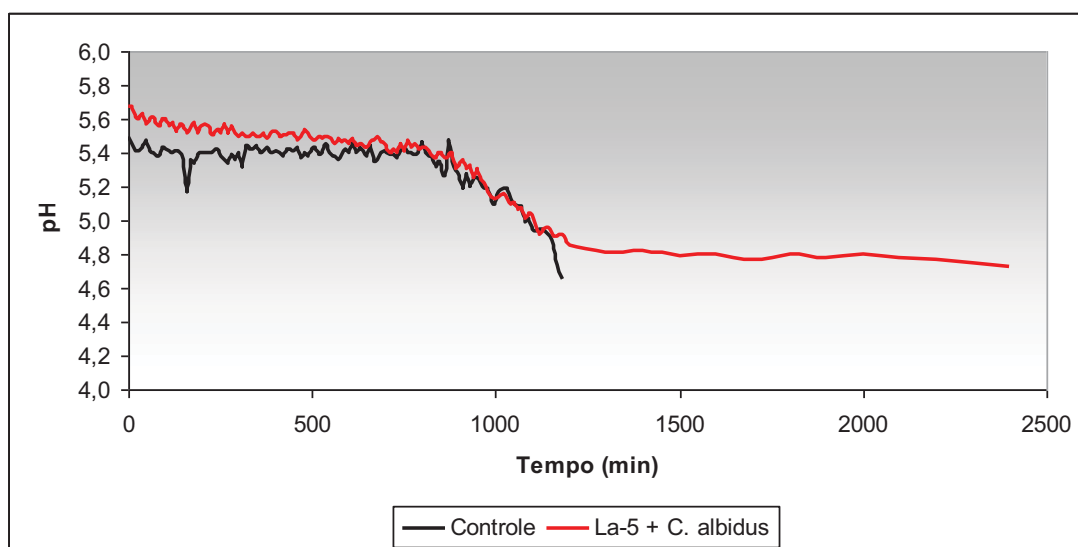
os valores de pH variaram de 4,50 a 3,62, aumentando assim, a acidez durante a vida de prateleira do produto.

As diferenças nos valores de pH e da acidez nos produtos lácteos podem estar relacionadas ao tipo e porcentagem de cultura utilizada, à atividade desta cultura, ao valor estabelecido para finalizar a fermentação, à quantidade de soro de leite utilizada na elaboração das bebidas lácteas, à adição de diferentes ingredientes, assim como ao tempo e a temperatura de armazenamento (THAMER; PENNA, 2006). Neste estudo, todos os fatores mencionados foram controlados, portanto, a adição das culturas leveduriformes foi responsável pelas oscilações nos valores de pH e de acidez. Por outro lado, uma pós-acidificação intensa pode afetar a viabilidade das bactérias lácticas, principalmente das bactérias probióticas *Bifidobacterium* sp. e *L. acidophilus* (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

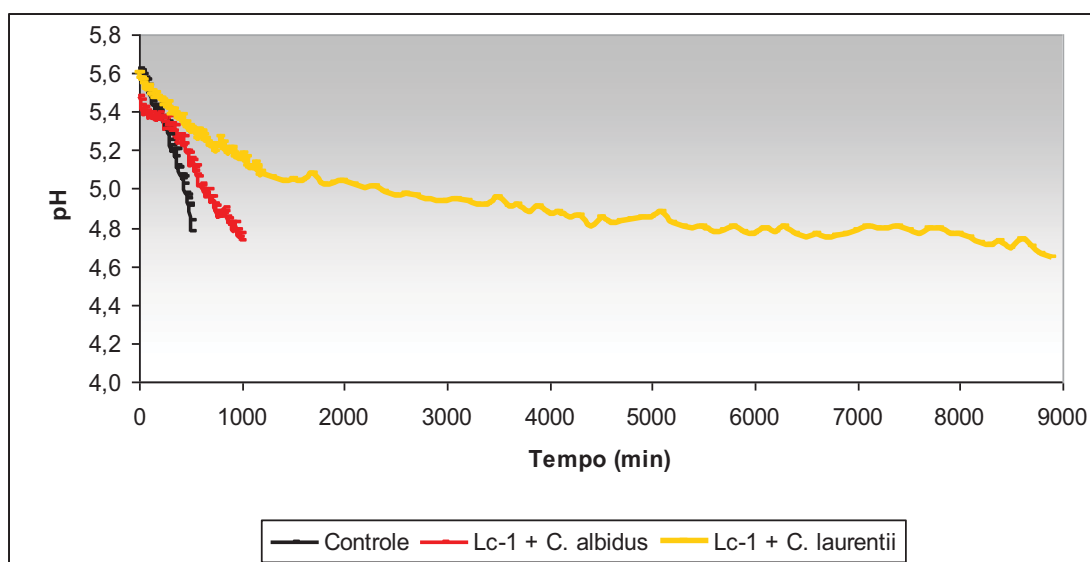
O tempo de fermentação das bebidas lácteas fermentadas por Bb-12, La-5 e Lc-1, foi maior na presença dos fungos leveduriformes do que nos tratamentos controle, sendo estatisticamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ), conforme as Tabelas 3, 4 e 5 e as Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.



**Figura 8** - Curvas de acidificação das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Bb-12.



**Figura 9** - Curvas de acidificação das bebidas lácteas fermentadas pela cultura La-5.



**Figura 10** - Curvas de acidificação das bebidas lácteas fermentadas pela cultura Lc-1.

As bebidas lácteas fermentadas por Bb-12 adicionadas dos leveduriformes *C. albidus* e *C. laurentii* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, porém, estaticamente diferentes ( $p > 0,05$ ), quando comparadas às bebidas lácteas do tratamento controle (Tabela 3, Figura 8).

O tempo de fermentação das bebidas fermentadas por La-5, adicionadas de *C. albidus* foi estatisticamente maior quando comparado ao tratamento controle (Tabela 4, Figura 9).

As bebidas lácteas fermentadas por Lc-1 apresentaram um tempo de fermentação superior na presença de *C. laurentii* em relação ao tratamento com *C. albidus* e ao tratamento controle, sendo estaticamente diferentes entre si (Tabela 5, Figura 10).

Em função das características intrínsecas de cada uma das culturas utilizadas, os tempos de fermentação observados foram superiores àqueles encontrados em processos industriais e também citados na literatura. Com intuito de estudar o efeito antimicrobiano das culturas probióticas separadamente, não foi utilizado no presente estudo as culturas tradicionais do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), também comumente utilizadas para bebidas lácteas. Estas bactérias do iogurte reduzem muito o tempo de fermentação do produto, por serem mais proteolíticas, possuírem maior poder de acidificação e maior atividade de  $\beta$ -galactosidase do que as culturas probióticas (SHAH, 2001; MADUREIRA, 2004). As culturas probióticas não produzem elevadas concentrações de ácidos láctico, cítrico e a galactose, sendo assim, o consumo desses ácidos pelos leveduriformes faz com que o tempo de fermentação aumente (VILJOEN et al., 2003; PAULA, 2010).

O uso de culturas tradicionais do iogurte resultou em menores tempos de fermentação nos estudos realizados por Madureira (2004), Gomes (2005) e Thamer e Penna (2006). Foram produzidas bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., que apresentaram tempo de fermentação variando de 270 a 350 minutos, 180 a 375 minutos, 180 a 255 minutos, respectivamente. Castro (2007) encontrou tempos de fermentação variando de 290 a 320 minutos em bebidas lácteas probióticas inoculadas com culturas mistas (La-5, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium animalis* Bb-12).

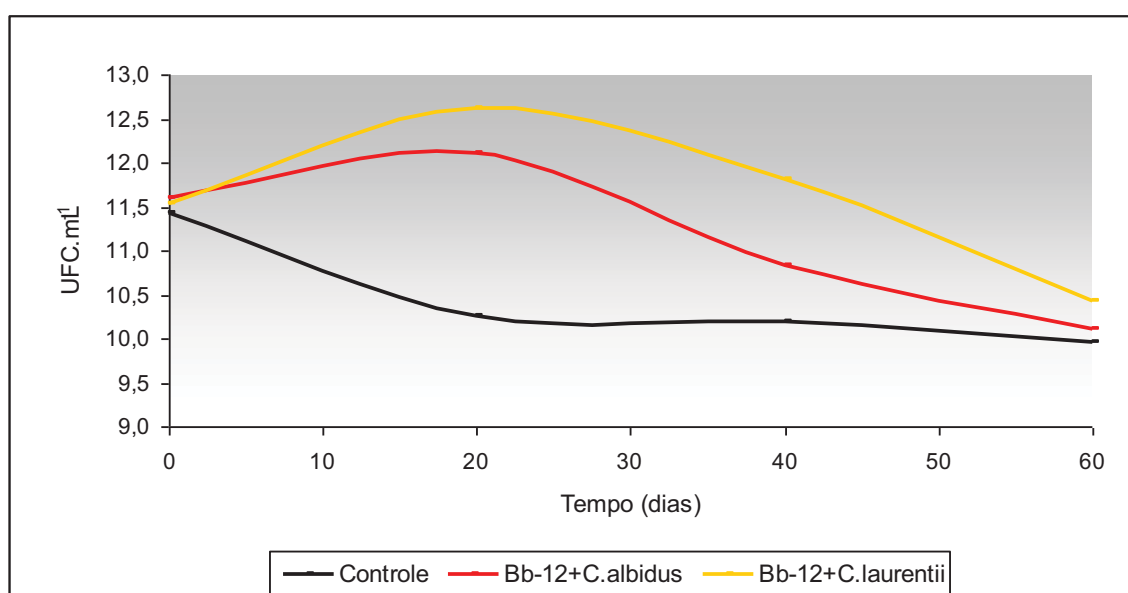
### **3.2.2 - Caracterização microbiológica**

#### **3.2.2.1 - Viabilidade das culturas probióticas**

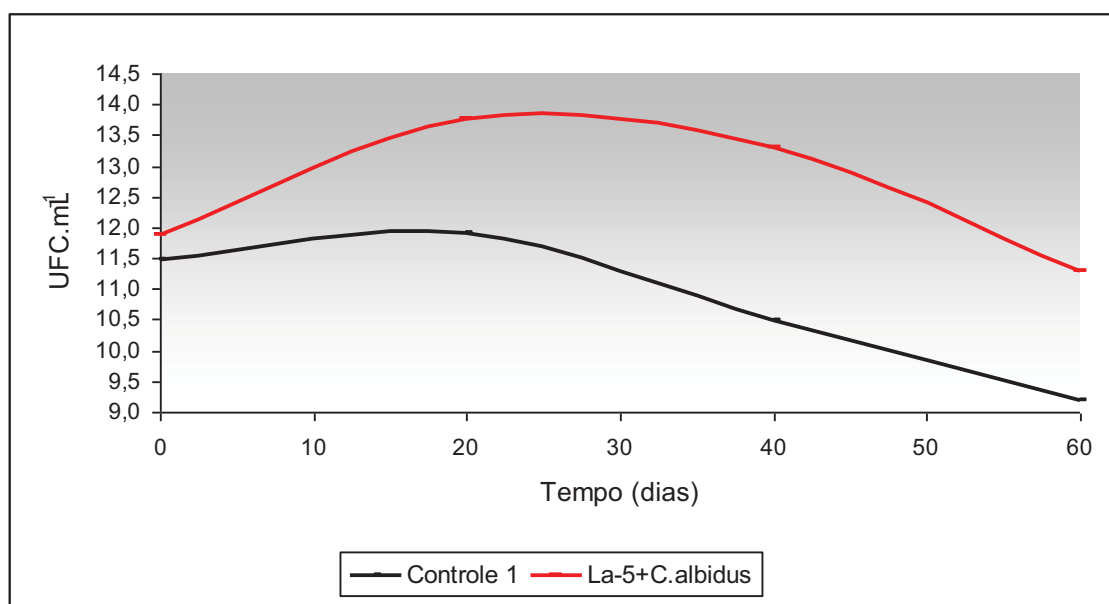
Durante a estocagem refrigerada, as densidades populacionais de Bb-12 (Figura 11) e La-5 (Figura 12) nas bebidas lácteas variaram de 12,62 a 9,94 log

UFC.mL<sup>-1</sup> e 11,73 a 9,17 log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. As populações de Lc-1 (Figura 13) foram superiores às de La-5 e Bb-12, variando de 14,32 a 10,02 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

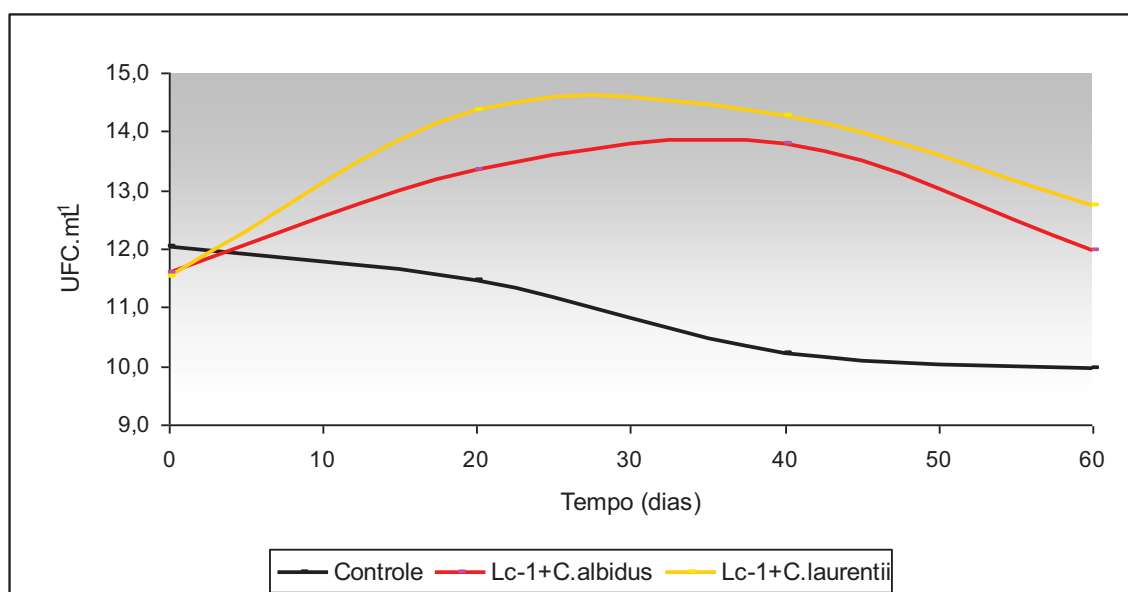
É comum a redução da viabilidade das bactérias lácticas e das probióticas durante a vida de prateleira de produtos lácteos fermentados, incluindo as bebidas lácteas. A presença dos fungos leveduriformes influenciou diretamente no aumento populacional das bactérias probióticas nas bebidas lácteas, diferentemente do que foi observado nos tratamentos controle, no qual houve a redução da densidade populacional de 2 ciclos logarítmicos durante o período de estocagem. Apesar da ausência dos leveduriformes nos produtos, provavelmente a liberação de metabólitos produzidos por eles, durante a fermentação da bebida, aumentou a viabilidade das bactérias probióticas.



**Figura 11** - População de Bb-12 em bebidas lácteas controle e adicionadas de *C. albidus* e *C. laurentii*, durante a estocagem refrigerada.



**Figura 12** - População de La-5 em bebidas lácteas controle e adicionada de *C. albidus*, durante a estocagem refrigerada.



**Figura 13** - População de Lc-1 em bebidas lácteas controle e adicionadas de *C. albidus* e *C. laurentii*, durante a estocagem refrigerada

A viabilidade e a atividade das bactérias probióticas durante a preparação e estocagem do produto é de grande importância sob o ponto de vista industrial. No entanto, diversos fatores podem afetar a viabilidade das bactérias probióticas, tais como, o baixo pH após a fermentação, o teor de oxigênio nos produtos, a temperatura, a baixa atividade proteolítica, o

desenvolvimento lento, a disponibilidade de nutrientes, o oxigênio dissolvido no leite e a adição de substâncias durante a etapa de produção (CASTRO, 2007; PAULA, 2010).

As bebidas lácteas elaboradas conforme todos os tratamentos, atenderam aos requisitos de viabilidade microbiana para a alegação do efeito funcional, de acordo com Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticas com Alegações de Propriedades Funcionais (BRASIL, 2005; BRASIL, 2008).

É importante ressaltar que a redução da viabilidade de certos probióticos como, *L. acidophilus* e das bifidobactérias em lácteos fermentados não é restrita aos produtos brasileiros e não está relacionada exclusivamente ao tempo de estocagem (BARRETO et al., 2003). Esse é um problema decorrente das condições de processo e vários estudos já demonstraram que a resistência de probióticos em iogurtes e leites fermentados é baixa. Levantamentos feitos com produtos comercializados em várias partes do mundo têm apresentado resultados com contagens muito baixas de *L. acidophilus* e bifidobactérias (SHAH et al., 1995; SHAH; WARNAKULSURIYA; LANKAPUTHRA, 1997; CASAROTTI, 2009).

São poucos os estudos relacionados à viabilidade de *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. animalis*, na forma de cultura pura, em bebidas lácteas fermentadas. Em co-cultura com culturas do iogurte, Madureira (2004) encontrou densidade populacional de *L. acidophilus* em bebidas lácteas funcionais, variando de 7,6 a 11,0 log UFC.mL<sup>-1</sup>, atendendo ao requisito de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de bactérias viáveis no produto, durante sua vida de prateleira. Em estudos semelhantes realizados por Gomes (2005) e Thamer e Penna (2006), foram encontradas densidades populacionais de 6,8 a 12,6 log UFC.mL<sup>-1</sup> e de 8,06 a 12,41 log UFC.mL<sup>-1</sup> de *Lactobacillus acidophilus*, respectivamente.

### 3.2.2.2 - Viabilidade das culturas leveduriformes

As bebidas lácteas fermentadas pelas culturas lácticas Bb-12, La-5 e Lc-1, inibiram o desenvolvimento de todos os leveduriformes testados, resultando em densidades populacionais inferiores a 10 UFC.mL<sup>-1</sup>, durante os 60 dias de estocagem avaliados.

Durante o processo de fermentação, ocorrem três fenômenos: a transformação da lactose em ácido láctico, conferindo o sabor ácido, reduzindo o valor de pH e resultando na coagulação do leite; a produção de diversos compostos voláteis; a formação de outros compostos, tais como exopolissacarídeos, que aumentam a viscosidade, além do ácido fólico e bacteriocinas (TAMIME; ROBINSON, 2007).

Devido às características intrínsecas ao produto, as bebidas lácteas proporcionam um ambiente favorável para o desenvolvimento de fungos leveduriformes. Porém, esses micro-organismos contaminantes não deveriam estar presentes no processo de fabricação pelos tratamentos térmicos realizados. A presença de fungos leveduriformes está associada às principais fontes de contaminação: os manipuladores, os equipamentos, a má sanitização, a adição de polpas de fruta ou outros ingredientes contaminados, resultado em alterações nas características do produto final, como sensoriais, físico-químicas e microbiológicas (VILJOEN et al., 2001).

A presença de fungos superiores ou iguais a  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> são frequentemente encontradas em iogurtes e bebidas, principalmente pela adição de polpas de frutas contaminadas (VILJOEN et al., 2001). Adicionalmente, o açúcar atua como um substrato para fermentação, favorecendo as condições de desenvolvimento dos leveduriformes.

#### **4 - Conclusão**

Todas as bebidas lácteas produzidas apresentam ausência dos fungos leveduriformes testados e elevada viabilidade probiótica, até os 60 dias de estocagem. A presença dos fungos leveduriformes influenciou os valores de pH e de acidez titulável durante a estocagem refrigerada, além de interferir no tempo de fermentação.

As culturas probióticas comerciais Bb-12, La-5 e Lc-1 demonstram potencial para serem utilizadas como bioconservantes, podendo contribuir com inovações tecnológicas nas indústrias lácteas, desenvolvendo alimentos seguros, saudáveis, com ampla vida de prateleira.

## 5 - Referências bibliográficas

ÁLVAREZ-MARTÍN, P. et al. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 1, p. 62-70, 2008.

ATANASSOVA, M. et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 12, p. 63-73, 2003.

BALDUÍNO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura inibidora em produtos cárneos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 356-362, 1999.

BARRETO, G. P. M. et al. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias lácticas totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 119-126, 2003.

BRANDÃO, W. A. P. L. N. T. M. **Elaboração de bebida láctea fermentada simbiótica de soro lácteo**. 70f. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 de agosto de novembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em julho, 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, julho de 2008.

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, Chichester, v. 23, n. 6, p. 415-437, 2006.

BUCK; B. L.; AZCARATE-PERIL, M. A.; KLAENHAMMER, T. R. Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 269-279, 2009.

CALDEIRA, L. A. et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2193-2198, 2010.

CASAROTTI, S. N. **Efeito de edulcorantes sobre a qualidade de leites fermentados**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

CASE, R. A.; BRADLEY, J. R. R. L.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15. ed. Washington, 1985. p. 327-404.

CASTRO, F. P. **Influência de diferentes proporções de soro de queijo e oligofrutose sobre as propriedades de bebidas lácteas fermentadas simbióticas**. 126f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2007.

COLLADO M. C.; HERNÁNDEZ, M.; SANZ, Y. Production of bacteriocinlike inhibitory compounds by potentially probiotic bifidobacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 5, p. 34-40, 2005.

DE MUYNCK, C. et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible anti-fungal metabolites. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 4, p. 339-346, 2004.

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

FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 12, p. 131-140, 2003.

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

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. **Bulletin of the IDF**, Brussels, n. 306, p. 23-33, 1995.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. Yogurt enumeration of characteristic microorganisms. **International IDF Standard**, Brussels, n. 41, p. 1-4, 1997.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 89, p. 755-768, 1996.

KIM, Y. et al. *Lactobacillus acidophilus* reduces expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors by inhibiting autoinducer-2-like activity. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 11, p. 1042-1050, 2008.

KOS, B. et al. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 699-707, 2008.

LIMA, S. M. C. G. **Desenvolvimento de uma bebida láctea à base de soro de queijo, fortificada com ferro**. 2003.154f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

LIU, S-Q.; TSAO, M. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 852-855, 2009.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 12 ed. São Paulo: Pearson - Prentice Hall, 2010. 608 p.

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

MARCHIORI, E. Alto valor agregado. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 65, p. 10-13, 2006.

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 109-115, 2005.

MUFANDAEDZA, J. et al. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 147-152, 2006.

NARDI, R. M. D. et al. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 649-656, 2005.

OSTLIE, H. M.; HELLAND, M. H.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 12, p. 17-27, 2003.

OSUNTOKI, A. A; EJIDE, O. R.; OMONIGBEHIN, E. A. Antagonistic effects on enteropathogens and plasmid analysis of lactobacilli isolated from fermented dairy products. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 7, n. 2, p. 311-316, 2008.

PAULA, A. T. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas. In: VENTURIM FILHO, W. G. **Bebidas lácteas não alcoólicas**. Vol. 2. São Paulo: Edgar Blucher, 2010. p. 89-119.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus* contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PRADO, C. S. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados sobre a *Listeria monocytogenes*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 4, p. 417-423, 2000.

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurt and fermented milk drinks. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 12, n. 11, p. 819-822, 1998.

REIS, J. A. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em bebidas lácteas fermentadas, adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

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.

SANZ, Y.; COLLADO, M. C.; DALMAU, J. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. **Acta Pediatrica Española**, Madrid, v. 64, n. 1, p. 74-78, 2006.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 8, p. 1901-1906, 1989.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 11, p. 4652, 2001.

SHAH, N. P. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

SHAH, N. P.; WARNAKULSURIYA E. V.; LANKAPUTHRA, W. E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 349-356, 1997.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows**. Disponível em: <http://www.assistat.com.br>. Acesso em: 27 set. 2009.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 3 ed. England: Woodhead Publishing Limited, 2007, 834 p.

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

VILJOEN, B. C. et al. Development of yeast populations during processing and ripening of blue veined cheese. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 4, p. 291-297, 2003.

VILJOEN, B. C. et al. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 12, p. 37-44, 2001.

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.

VOULGARI, K. et al. Antifungal activity of nonstarter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, New York, v. 21, n. 2, p. 136-142, 2010.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 185-194, 1998.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 23, p. 91-109, 2002.

YANG, V. W.; CLAUSEN, C. A. Determining the suitability of lactobacilli antifungal metabolites for inhibiting mould growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 67, p. 977-981, 2005.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.