

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS E
ACEITAÇÃO SENSORIAL DE LEITES FERMENTADOS POR
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE
QUEIJO COALHO DE PERNAMBUCO

DEBORA PINHEIRO GUIMARÃES MENDES

BELO HORIZONTE
2011

Debora Pinheiro Guimarães Mendes

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS E
ACEITAÇÃO SENSORIAL DE LEITES FERMENTADOS POR
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE
QUEIJO COALHO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

BELO HORIZONTE
Escola de Veterinária UFMG
2011

M538c **Mendes, Debora Pinheiro Guimarães, 1985-**
Características físico-químicas e microbiológicas e aceitação sensorial de leites fermentados por bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo coalho de Pernambuco / Debora Pinheiro Guimarães Mendes. – 2011.

63 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite fermentado – Análise – Teses. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses.
3. Avaliação sensorial – Teses. 4. Lactobacilo – Teses. I. Souza, Marcelo Resende de.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.3

ASSINATURAS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve e estará comigo.

Ao meu esposo, Ricardo, pelo apoio, carinho, amor e compreensão. Pela oportunidade que me deu de fazer esse mestrado, e pelas inúmeras vezes que ficou em casa sozinho enquanto eu estava na UFMG.

À minha mãe, aos meus avós e aos meus tios Alexandre, Aparecida e Cecília e suas respectivas famílias e ao meu tio Gastão, que sempre apoiaram e entenderam que as ausências eram necessárias para que hoje eu chegasse até aqui.

Ao professor Marcelo Resende pela orientação, dedicação, amizade e confiança.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado, em especial Fernanda Magalhães, Alice Ferreira, Camila Couto, Maria Carolina Paes, Guilherme Marcondes, Leonardo Acurcio pelo companheirismo, amizade, carinho.

Aos professores do DTIPOA, em especial à Mônica Leite e Claudia Penna, pela colaboração neste projeto, sempre com boas sugestões.

Aos funcionários do DTIPOA, em especial à Maura, Taynara, Marco Antônio, pelo suporte nas análises e nos momentos de dúvida, ao Milton, por sempre estar disposto a nos atender na secretaria com um sorriso no rosto.

Aos alunos de iniciação científica, Marcos Galletti e Dalila Lapinha, que sempre estavam dispostos quando solicitados, pela ajuda em todos os momentos e pelo companheirismo.

Ao Danilo, pelo brilhante suporte na estatística e durante todo o processo de discussão dos resultados.

Aos professores e ex-professores do Centro Universitário de Belo Horizonte, em especial à professora Lúcia Peret, Viviane Birchall e Cléia Ornellas, que sempre me apoiaram.

Aos colegas da UNIPAC VALE DO AÇO, em especial aos coordenadores William Saliba e Arilton Barcelar. Aos meus alunos, em especial à turma de formandos do 2º semestre de 2010 do Curso de Farmácia, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos amigos, especialmente Vivianne Rosental, William Silva, Isismílian Hastenreiter, Silvana Angélica, que sempre apoiaram para a realização deste sonho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, por confiarem e acreditarem em mim e no meu potencial.

“Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho sem sacrificar sábados e domingos pelo menos uma centena de vezes. Se quiser atingir uma meta em especial, terá de estudar no horário em que os outros estão tomando chopp e comendo batata frita.

Terá de planejar, enquanto os outros permanecem na frente da televisão. Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina. A realização de um sonho depende da dedicação”.

Roberto Shinyashiki

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	18
3. HIPÓTESES	18
4. REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1. Leites fermentados.....	19
4.1.1. Histórico	19
4.1.2. Legislação brasileira.....	19
4.2. Probióticos	21
4.2.1. Histórico	21
4.2.2. Definições.....	22
4.2.3. Leites fermentados probióticos.....	22
4.2.4. Efeitos benéficos.....	23
4.3. O gênero <i>Lactobacillus</i>	24
4.3.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	26
4.3.2. <i>Lactobacillus fermentum</i>	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1. Delineamento experimental.....	28
5.2. Controle de qualidade do leite em pó desnatado	29
5.3. Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído e tratado termicamente	29
5.4. Microrganismos	29
5.5. Curvas de fermentação/ crescimento	30
5.6. Preparo dos leites fermentados	30
5.7. Análises laboratoriais dos leites fermentados.....	31
5.7.1. Avaliação físico-química dos leites fermentados	31
5.7.2. Avaliação microbiológica dos leites fermentados	31
5.7.2.1. Enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico.....	31
5.7.2.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	31

5.7.2.3. Pesquisa de bolores e leveduras.....	32
5.8. Avaliação sensorial dos leites fermentados	32
5.9. Análise Estatística	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1. Controle de qualidade do leite em pó desnatado	33
6.2. Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído	35
6.3. Curva de Fermentação / Crescimento.....	35
6.3.1. pH	35
6.3.2. Acidez Titulável	37
6.3.3. Enumeração das bactérias produtoras de ácido láctico	38
6.4. Avaliação físico-química dos leites fermentados	39
6.4.1. pH	39
6.4.2. Acidez Titulável	40
6.4.3. Teor de proteína.....	41
6.4.4. Teor de gordura	41
6.4.5. Teor de umidade e extrato seco total	42
6.5. Avaliação microbiológica dos leites fermentados	43
6.5.1. Enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico.....	43
6.5.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	44
6.5.3. Pesquisa de bolores e leveduras.....	45
6.6. Avaliação sensorial dos leites fermentados	45
6.6.1. Teste de aceitação pela escala hedônica de cinco pontos	45
6.6.2. Teste de aceitação pela escala não estruturada.....	46
7. RESUMO DOS RESULTADOS.....	47
8. CONCLUSÕES	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
10. ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teores percentuais médios de acidez titulável e componentes físico-químicos dos três lotes de leite em pó desnatado.....	34
Tabela 2: Resultados médios percentuais de três repetições pH de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração entre 8 a 10 °C, durante 45 dias de estocagem.....	39
Tabela 3: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de acidez titulável de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração entre 8 e 10°C, durante 45 dias de estocagem.....	40
Tabela 4: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de proteína de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração entre 8 e 10°C, durante 45 dias de estocagem.....	41
Tabela 5: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de umidade de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração a 8-10 °C, durante 45 dias de estocagem	42
Tabela 6: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de extrato seco total de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração entre 8 e 10 °C, durante 45 dias de estocagem.....	43
Tabela 7: Contagens médias (UFC/g) em ágar MRS, de três repetições de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração a 8-10 °C, durante 45 dias de estocagem	43
Tabela 8: Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração entre 8 a 10 °C, durante 60 dias de estocagem.....	45
Tabela 9: Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala não estruturada) dos leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , armazenados sob refrigeração entre 8 e 10 °C, durante 60 dias de estocagem.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Requisitos físico-químicos oficiais para inspeção de leites fermentados no Brasil.....	20
Quadro 2: Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de leites fermentados no Brasil.....	20
Quadro 3: Contagem de microrganismos específicos para inspeção de leites fermentados no Brasil.....	21
Quadro 4: Principais efeitos benéficos do consumo de leites fermentados contendo microrganismos probióticos e seus mecanismos	24
Quadro 5: Linhagens de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> utilizadas na fermentação de alimentos e seus respectivos benefícios à saúde humana	27
Quadro 6: Linhagens de <i>Lactobacillus fermentum</i> utilizadas na fermentação de alimentos e seus respectivos benefícios à saúde humana	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Médias de duas repetições de pH durante a fermentação de leites fermentados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Lactobacillus fermentum* (LF)..... 36

Figura 2: Médias de duas repetições de acidez titulável (%) durante a fermentação de leites fermentados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Lactobacillus fermentum* (LF)..... 37

Figura 3: Médias de duas repetições das contagens (log UFC/g) durante a fermentação de leites fermentados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Lactobacillus fermentum* (LF)..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
µl	microlitro
a.C.	antes de Cristo
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>B. lactis</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
CPS	Concentrado Proteico de Soro
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
EC	<i>Escherichia coli</i>
EV	Escola de Veterinária
g	gramas
IN	Instrução Normativa
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LF	Leite fermentado por <i>Lactobacillus fermentum</i>
LR	Leite fermentado por <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
mín.	mínimo
ml	mililitro
MRS	de Man, Rogosa e Sharpe
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	número mais provável
°C	Graus Celsius
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

ANEXOS

Anexo 1: Teste de Gram <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (100x de aumento – Microscópio óptico).....	55
Anexo 2: Teste de Gram <i>Lactobacillus fermentum</i> (100x de aumento – Microscópio óptico).....	56
Anexo 3: Crescimento em caldo MRS do <i>Lactobacillus fermentum</i> após 72 horas de incubação.....	57
Anexo 4: Crescimento em Caldo MRS do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> após 72 horas de incubação.....	58
Anexo 5: Fotografia do coágulo formado por <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	59
Anexo 6: Fotografia do coágulo formado por <i>Lactobacillus fermentum</i>	60
Anexo 7: Modelo da Ficha de Análise Sensorial utilizada nas análises sensoriais dos leites fermentados estocados por 15 e 60 dias sob refrigeração à 8-10°C.....	61
Anexo 8: Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a Análise Sensorial.....	62
Anexo 9: Média das duas repetições do tempo de fermentação dos leites desnatados adoçados esterilizados adicionados de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	63

RESUMO

No Brasil, assim como em todo o mundo, o consumidor vem buscando alimentos que além de prover necessidades nutricionais tragam benefícios a sua saúde; e é neste contexto que se destacam os alimentos contendo microrganismos probióticos, tendo como principais representantes os leites fermentados. A produção brasileira de leites fermentados é baseada na utilização de microrganismos iniciadores importados, comercializados por empresas estrangeiras. Verifica-se que há um grande potencial para a utilização de bactérias produtoras de ácido láctico, potencialmente probióticas, isoladas de produtos lácteos artesanais brasileiros, como o queijo coalho de Pernambuco. O presente trabalho teve como objetivo elaborar leites fermentados a partir de bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo coalho produzido em Pernambuco, Brasil; avaliar a habilidade de bactérias produtoras de ácido láctico, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* fermentarem isoladamente o leite e resultar em produtos finais com características sensoriais distintas; e avaliar a viabilidade dessas bactérias, bem como as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos leites fermentados durante 45 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C. As curvas de fermentação obtidas a partir de valores de pH, acidez titulável (%) e enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico, indicaram valores mais altos de acidez titulável e conseqüentemente valores mais baixos de pH para *Lactobacillus rhamnosus*. Em relação às contagens de microrganismos produtores de ácido láctico, os dois leites fermentados apresentaram quantidades adequadas de microrganismos viáveis, acima de 10^8 UFC/g. Em relação às análises sensoriais, os leites fermentados com 15 dias apresentaram melhor aceitabilidade entre os provadores, em relação àqueles analisados aos 60 dias de estocagem sob refrigeração à 8-10°C.

Palavras chaves: leites fermentados, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, probióticos potenciais

ABSTRACT

In Brazil, as well as around the world, the consumer has been searching for foods that meet nutritional features and bring benefits to health, and one alternative for fit those requirements are the foods containing probiotics, mainly fermented milks. The Brazilian production of fermented milks is based on the use of imported starter cultures, marketed by foreign companies. However, there is great potential for the use of lactic acid bacteria isolated from artisanal dairy products made in Brazil, as the “coalho cheese” from Pernambuco. This study aimed to elaborate fermented milks from potentially probiotic lactic acid bacteria isolated from that cheese; to evaluate the ability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus fermentum*, isolatedly, ferment milk and result in final products with different sensory characteristics; to assess the viability of those bacteria in the fermented milks, as well as analyze the physical-chemical, microbiological, and sensory properties of them during storage for 45 or 60 days under refrigeration at 8-10°C. Fermentation profiles showed higher levels of acidity and lower values of pH in milks fermented by *Lactobacillus rhamnosus*. Both two fermented milks presented adequate quantities of viable micro-organisms, above 10^8 CFU/g throughout the analyzed period. Regarding the sensory analysis, fermented milk analyzed at 15 days showed better acceptability of the panelists than at 60 days.

Key-words: fermented milks, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, potentially probiotics

1. INTRODUÇÃO

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

Oliveira *et al.* (2009) citam que, atualmente, os consumidores brasileiros estão buscando alimentos com mais sabor e aroma agradáveis, de baixo valor calórico ou baixo conteúdo de gordura, e com efeitos benéficos para a saúde.

Esses benefícios associados com o consumo de leites fermentados são relacionados à capacidade probiótica que os mesmos contêm. De um modo geral, os leites fermentados contêm microrganismos considerados probióticos, como *Lactobacillus* spp. As principais espécies de *Lactobacillus* que são utilizadas nos leites fermentados brasileiros são *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*. Além de *Lactobacillus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* e *Bifidobacterium* spp. também são empregados (Botelho, 2005).

A palavra probiótico é de origem grega e tem como significado em favor da vida (pró – favor; bio – vida). Originalmente, a proposta, que foi idealizada para microrganismos

probióticos era descrever compostos produzidos por um protozoário que estimulava o crescimento de outros organismos (Lilley & Stillwell, 1965 citados por Gomes & Malcata, 1999). Fuller (1989), após revisar sobre o assunto, definiu probióticos como suplementos alimentares na forma de microrganismos vivos que têm um efeito benéfico na saúde dos consumidores, por manter o equilíbrio da microbiota intestinal. Com o passar do tempo e a execução de pesquisas, várias definições para probióticos foram idealizadas e, atualmente, a mais aceita é a que probióticos são microrganismos vivos administrados em quantidades suficientes para conferir efeito benéfico à saúde do hospedeiro (JOINT FAO/WHO, 2002).

Atualmente, têm-se diversos estudos mostrando os efeitos benéficos de leites fermentados contendo microrganismos probióticos, dentre eles, a redução da diarreia infantil, redução da concentração de colesterol no sangue e estímulo ao sistema imunológico (Komatsu *et al.*, 2008). Além desses benefícios, podem-se destacar efeitos benéficos no intestino, como por exemplo, ação antibacteriana, com possível proteção contra gastroenterites, contribuindo para o bom funcionamento intestinal e uma potencial atividade antitumoral (Gomes & Malcata, 1999).

Nas últimas duas décadas, o interesse na manipulação da microbiota intestinal vem crescendo, principalmente quando se trata da prevenção de enfermidades. Com isso, o uso de microrganismos produtores de ácido láctico, entre os quais estão incluídas a grande maioria

das bactérias potencialmente probióticas, tem sido muito difundido, com diversas aplicações nutricionais e médicas em todo o mundo (Lara-Villoslada, 2009).

O grupo *Lactobacillus* é composto por bactérias Gram-positivo, em forma de bastonetes (bacilos), catalase-negativo. Em alimentos, em geral, são microaerófilos, mas também inclui espécies anaeróbicas, como no trato gastrointestinal de humanos e animais (Jay, 1996).

Os leites fermentados contêm bactérias do gênero *Lactobacillus* spp., principalmente do grupo *Lactobacillus casei*, do qual faz parte o *Lactobacillus rhamnosus*. Buriti & Saad (2007) relataram que, desde aproximadamente 1930, há leites fermentados contendo *Lactobacillus casei*.

Lactobacillus fermentum é a principal espécie de *Lactobacillus* obrigatoriamente heterofermentativo presente no trato digestivo humano, e também é empregado na indústria de laticínios como cultura iniciadora (Fons *et al.*, 1997 e Dickson *et al.*, 2005).

Leites fermentados contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* não são comuns no Brasil, como já mencionado, mas na Europa há leites fermentados com essas bactérias produtoras de ácido láctico.

A utilização de novas culturas lácticas potencialmente probióticas, como *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*, em conjunto com o desenvolvimento contínuo de

novas tecnologias de produção de leites fermentados, podem ocasionar, para as indústrias, aumento de rendimento e lançamento de novos produtos fermentados produzidos a partir de bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de produtos lácteos artesanais brasileiros, tendo em vista que a produção de leites fermentados no Brasil baseia-se na fermentação a partir de microrganismos iniciadores comercializados por empresas estrangeiras. Desta forma, o desenvolvimento de leites fermentados a partir dessas bactérias testadas quanto às propriedades probióticas, e a avaliação de suas características físico-químicas e microbiológicas e seus perfis sensoriais pode viabilizar registros de patentes, além de estimular a elaboração de produtos lácteos (Guedes Neto, 2004).

Neste trabalho, as espécies de *Lactobacillus* utilizadas foram *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, os quais, segundo Gardiner *et al.* (2002), são agentes probióticos capazes de auxiliar no tratamento de infecções urogenitais em mulheres, além de outras funções. Portanto, a utilização de novas culturas lácticas com potencial probióticas, como *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*, aliada ao desenvolvimento de novas tecnologias de produção dos leites fermentados podem propiciar aumento de rendimento para as indústrias e lançamento de produtos fermentados brasileiros, com maior potencial funcional, sendo por isso justificada a realização deste trabalho.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Elaborar leites fermentados a partir de bactérias produtoras de ácido láctico, isoladas de queijo coalho produzido em Pernambuco, Brasil.
- Avaliar a habilidade de bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*) em fermentar o leite e resultar em produtos finais com características sensoriais distintas.
- Avaliar a viabilidade de bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*), bem como as características físico-químicas e microbiológicas durante 45 dias de estocagem sob refrigeração e o perfil sensorial dos leites fermentados durante 60 dias de estocagem sob refrigeração.

3. HIPÓTESES

Para a realização deste trabalho foram levantadas hipóteses, as quais estão descritas a seguir:

- Bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo de coalho poderiam ser utilizadas isoladamente ou em associação na elaboração de leites fermentados, resultando em produtos com diferentes características sensoriais.
- Os leites fermentados produzidos a partir de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* possuiriam características físico-químicas e microbiológicas compatíveis com os padrões brasileiros, incluindo a viabilidade de bactérias probióticas, durante todo o período de estocagem.
- Leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* apresentariam características sensoriais distintas entre si.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Leites fermentados

4.1.1. Histórico

Leites fermentados são produtos resultantes do crescimento seletivo de bactérias específicas em leite. Estes produtos estão presentes no mundo há milhares de anos e acredita-se que os mesmos tenham surgido na área que atualmente corresponde ao Oriente Médio. Isso foi em decorrência, provavelmente, da necessidade de se conservar o leite por mais tempo na ausência de refrigeração (Kosikowski, 1977).

Os leites fermentados não possuem uma data de origem definida, pois há muito tempo são produzidos, mesmo que de forma empírica. Na própria Bíblia, há indícios de que Abraão consumia este tipo de alimento, pois sua longevidade era atribuída a um leite “mágico”, que curava doenças (Robinson, 1991).

No começo do século XX, a partir de estudos de Elia Metchnikoff (1845-1916), na França – Instituto *Pasteur*, houve uma associação da produção de leites fermentados com o metabolismo de microrganismos lácteos. A partir disso, ocorreu o isolamento e a caracterização de várias culturas lácticas, assim como o processo fermentativo começou a ser controlado e padronizado pelas indústrias (Robinson, 1991).

A tecnologia da produção de leites fermentados é conhecida desde os tempos mais remotos em várias partes do mundo. Inicialmente, sua produção

era de forma “espontânea”, ou seja, a fermentação era realizada por microrganismos que já estavam presentes no local. O uso de culturas iniciadoras ficou mais conhecido e difundido a partir da metade do século XX (Mongensen *et al.*, 2003).

Atualmente, os leites fermentados são produzidos em condições controladas com culturas iniciadoras específicas. As razões para fermentar leites são diversas e a principal função é de aumentar a vida de prateleira, ou prazo de validade, além das outras funções como: melhorar a textura do leite, reforçar a digestibilidade do produto e produção de outros produtos, como iogurte e queijos (Robinson & Tamine, 2006).

4.1.2. Legislação brasileira

Leites fermentados são definidos (Brasil, 2007) como “os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Esses microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade”, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados inclui na categoria de leites fermentados os seguintes produtos: o iogurte, o leite fermentado ou cultivado, o leite acidófilo ou acidofilado, o kefir, o kumys e a coalhada (Brasil, 2007).

Os ingredientes obrigatórios para a produção de leites fermentados são o leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura e o cultivo de bactérias lácticas específicas ou não, dentre as quais podem ser utilizadas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Os ingredientes opcionais são leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, frutas em forma de pedaços, polpa(s), suco(s) e outros preparados à base de frutas, maltodextrinas, além de outras substâncias alimentícias, tais como:

mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café e outras, sós ou combinadas. Adicionalmente, podem ser incorporados açúcares e/ou glicídios (exceto polialcoóis e polissacarídeos); cultivos de bactérias lácticas subsidiárias e amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de 1% (m/m) do produto final. Os ingredientes opcionais não lácteos, sós ou combinados, deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final (Brasil, 2007).

Os requisitos físico-químicos e microbiológicos para o controle de qualidade de leites fermentados, segundo a legislação brasileira (Brasil, 2007), encontram-se no Quadro 1 e 2.

Quadro 1: Requisitos físico-químicos oficiais para inspeção de leites fermentados no Brasil

Matéria gorda láctea (g/100g) Norma FIL 116 A:1987				Acidez (g de ácido lático/100g) Norma FIL 150:1991	Proteínas lácteas (g/100g)
Com creme	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado		
Min. 6,0	3,0 a 5,9	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Min. 2,9

Fonte: Brasil (2007)

Quadro 2: Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de leites fermentados no Brasil

Microrganismos	Critério de aceitação	Norma
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=10 M=100	FIL73A:1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m<3 M=10	APHA 1992c.24
Bolores e leveduras/g	n=5 c=2 m=50 M=200	FIL94B:1990

Fonte: Brasil (2007)

As contagens mínimas de microrganismos específicos que devem estar presentes nos leites fermentados,

segundo a legislação brasileira, são apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3: Contagem de microrganismos específicos para inspeção de leites fermentados no Brasil

Produto	Contagem de bactérias lácticas totais (UFC/g) Norma FIL 117A: 1988	Contagem de leveduras específicas (UFC/g) Norma FIL 94 B: 1990
Iogurte	mín. 10^7 (*)	-
Leite fermentado ou cultivado	mín. 10^6 (*)	-
Leite acidófilo ou acidofilado	mín. 10^7	-
Kefir	mín. 10^7	mín. 10^4
Kumys	mín. 10^7	mín. 10^4
Coalhada	mín. 10^6	-

(*) No caso em que se mencione o uso de bifidobactérias, a contagem será no mínimo 10^6 bifidobactérias/g

Fonte: Brasil (2007)

4.2. Probióticos

4.2.1. Histórico

A utilização de microrganismos que trazem benefícios ao homem acontece desde milhares de anos atrás, apesar de serem usados empiricamente. Leveduras e bactérias acidificantes faziam-se presentes nos primeiros alimentos fermentados, os quais já eram mencionados no Antigo Testamento da Bíblia, em Gênesis 18:8, passagem na qual há menção sobre o consumo de queijos. Em 76 a.C. Plinius, historiador romano recomendou o uso de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites (Kroeger *et al.*, 1989 e Robinson, 1991).

Em 1906, Tissier, um cientista francês, forneceu importantes informações sobre

o uso de probióticos, recomendando a crianças que estavam com diarreia o uso de *Bifidobacterium* spp., alegando que as mesmas iriam competir com os microrganismos indesejáveis presentes no intestino, eliminando-os e dominando a microbiota intestinal, acabando assim com a diarreia (Ballongue, 1993).

Com o passar do tempo, a tecnologia de processamento de leites fermentados foi melhorada e, a partir de estudos de Elia Metchnikoff (1845-1916), em 1907, evidenciou-se, pela primeira vez, uma relação entre a fermentação do leite e o papel das bactérias e leveduras acidificantes (Jay, 1996). Essa relação foi possível com o estudo da longevidade dos búlgaros realizada por Metchnikoff, a qual era relacionada com o consumo de leites fermentados por

esse povo. Metchnikoff, em 1908, foi o primeiro pesquisador a defender publicamente o consumo de leites fermentados, principalmente o iogurte, como alimentos que ocasionam benefícios à saúde (Robinson, 1991).

Estudos realizados na tribo Maasai (África) mostraram que os nativos ingeriam grandes quantidades de carnes vermelhas, mas que consumiam um leite fermentado local, denominado *kule naoto* em altas quantidades e quase não possuíam problemas de hipercolesterolemia. O *kule naoto* é um leite fermentado por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Isso pode ser explicado pelo fato de que essas bactérias possuem a capacidade de desconjugar sais biliares no intestino, evitando sua absorção e utilização para síntese *de novo* de colesterol (Jay, 1996).

4.2.2. Definições

Data-se 1960, a utilização pela primeira vez do termo probiótico, por Richard Parker, tendo como significado “a favor da vida”, ressaltando que *probiótico* é uma palavra de origem grega.

Logo após essa definição, Lilley e Stiwell, em 1965, utilizaram esse mesmo termo para designar substâncias secretadas por microrganismos que estimulam o crescimento de outro. Posteriormente, Fuller (1989) modificou tal conceito e introduziu uma nova definição, caracterizando probiótico como “suplemento alimentar composto por microrganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro pelo equilíbrio da microbiota intestinal”.

Em 1998 o Instituto Internacional de Ciência da Vida (*International Life Science Institute*), incluiu no conceito de probióticos os termos “saúde e bem estar”, servindo como base para o conceito de Salminen (1999), o qual definiu probióticos como preparados de microrganismos, ou seus constituintes, que têm efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro.

Atualmente, o conceito de probióticos mais utilizado é o designado por uma cúpula de pesquisadores da Organização de Agricultura e Alimentos e da Organização Mundial de Saúde é o seguinte: probióticos são microrganismos vivos administrados em quantidades suficientes para conferir efeito benéfico à saúde do hospedeiro (JOINT FAO/WHO, 2002).

Fuller (1989) apontou que os microrganismos probióticos são basicamente bactérias produtoras de ácido láctico, entre as quais se destacam espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* e *Streptococcus*.

4.2.3. Leites fermentados probióticos

Segundo Fuller (1989), os probióticos presentes no mercado contêm microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, principalmente *Streptococcus thermophilus*, em sua maioria. Alguns contêm bifidobactérias, mas são poucos, pois como são bactérias anaeróbicas, deve-se criar uma condição total de anaerobiose para garantir o seu crescimento, uma vez que qualquer contato com o oxigênio, estes não sobrevivem. A justificativa do uso de

Lactobacillus é devido ao fato de que os mesmos colonizam a microbiota do organismo humano após o nascimento, em grande quantidade, e quando ocorre o aumento da sua concentração, ocorre o decréscimo da concentração de outros microrganismos patogênicos ou deteriorantes.

Kurmann e Rassic (1991), Gomes e Malcata (1999) e Lourens-Hatting e Viljoen (2001) enfatizaram que os fabricantes de leites fermentados devem observar se os produtos contêm o número satisfatório de microrganismos viáveis para serem denominados probióticos. Esse número é no mínimo 10^6 UFC/mL, devido à dose terapêutica ser de 10^8 a 10^9 células viáveis em 100g de produto.

A viabilidade dos microrganismos probióticos em leites fermentados pode ser afetada durante as etapas de distribuição do produto (tanto da indústria para o mercado quanto do mercado para a casa do consumidor) devido à exposição a diferentes fatores, como aumento da acidez, presença/ausência de oxigênio (dependendo do tipo de microrganismo), presença de componentes antimicrobianos e temperatura de armazenamento. Além disso, os microrganismos probióticos são muito susceptíveis a condições no ambiente em que estão crescendo, como acidez e altas temperaturas (Vasiljevic & Shah, 2008).

4.2.4. Efeitos benéficos

Para que um microrganismo seja selecionado e utilizado em produtos probióticos, é necessário que o mesmo

possua características importantes, entre as quais se destacam: serem produzidos em larga escala, permanecerem estáveis e viáveis durante a estocagem; serem capazes de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal e nele sobreviver; produzir efeito benéfico ao hospedeiro; reduzir a adesão de patógenos; modular a atividade imunológica e a produção de toxinas e não ser patogênico (JOINT FAO/WHO, 2002).

Fuller (1989) relatou que o modo de ação de microrganismos probióticos ocorre de forma que o consumo de alimentos contendo a concentração adequada dos mesmos vai resultar na produção de componentes antimicrobianos e competição por nutrientes, competição por sítios de adesão; além disso, eles alteram o metabolismo microbiológico, ou aumentando ou diminuindo a atividade enzimática (isso depende do que é melhor para o hospedeiro); e também estimulam a atividade imune.

Os benefícios ocasionados pelo consumo de alimentos contendo microrganismos probióticos são muitos, podendo ser citados redução da diarreia infantil, prevenção a diarreia do viajante, redução da concentração de colesterol no sangue e estímulo ao sistema imunológico (Komatsu *et al.*, 2008). Além desses benefícios, podem-se destacar efeitos benéficos no intestino, como por exemplo, ação antibacteriana, com possível proteção contra gastroenterites e uma atividade antitumor potencial (Gomes & Malcata, 1999). Outros benefícios que são destacados por Fuller (1989) são alívio

da intolerância à lactose e da constipação.

O'Sullivan *et al.* (1992) citaram que a colonização do trato gastrointestinal humano sofre a interferência de três tipos de fatores, a saber: fatores microbiológicos, ambientais e relacionados aos hospedeiros. Os fatores microbiológicos incluem interações bacterianas (antagonismo e simbiose) e exigências do microrganismo (requisitos de crescimento, propriedades de adesão).

Os fatores ambientais incluem alimentação do hospedeiro e remédios ingeridos pelo mesmo. Os fatores relacionados ao hospedeiro incluem a produção de ácidos (clorídrico, láctico e ácidos graxos), enzimas (gástricas, pancreáticas e epiteliais) e sais biliares; peristaltismo e mecanismos de imunidade.

Os principais benefícios do consumo de leites fermentados que veiculam microrganismos probióticos estão resumidos no Quadro 4.

Quadro 4: Principais efeitos benéficos do consumo de leites fermentados contendo microrganismos probióticos e seus mecanismos

Efeito benéfico	Mecanismo
Alívio na intolerância da lactose	Transporta β -galactosidase para o trato gastrointestinal humano.
Prevenção e redução dos sintomas da diarreia causada por antibióticos e/ou vírus	Exclusão competitiva; aumento da resposta imune.
Redução de risco associado a agentes carcinogênicos	Alteração da microbiota intestinal; alteração do metabolismo ativo intestinal, aumentando a imunidade intestinal.
Efeito de hipercolesterolemia	Desconjugação de sais biliares.
Inibição da <i>Helicobacter pylori</i> e patógenos intestinais	Exclusão competitiva; efeito de barreira; produção de compostos antimicrobianos.
Estímulo ao sistema imune	Regulação da atividade de fagocitose; reconhecimento pelos receptores toll-like (TLR): regulação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.

Fonte: Adaptado de Vasiljevic e Shah, 2008

4.3. O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* engloba bactérias de muito interesse prático e científico. Bactérias produtoras de ácido láctico vêm sendo usadas na preparação

de vários tipos de alimentos para homens e animais desde os tempos mais remotos (Bottazzi, 1998).

Lactobacillus ssp. inclui bactérias produtoras de ácido láctico que estão

presentes em vários habitats, sendo bastante difundidas no ambiente (no solo e na água), presentes em alimentos e também no organismo de animais e humanos. Nestes, fazem parte da microbiota indígena da cavidade oral, do trato gastrointestinal e do trato genital feminino (Lee & Salminen, 1995, Gomes & Malcata, 1999 e Coudeyras *et al.*, 2008).

Segundo *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Sneath *et al.*, 1996), as células de *Lactobacillus* possuem formato de bastão e possuem tamanho regular. Sua temperatura ótima de crescimento está em torno de 30 a 40°C. Esse gênero compreende um grupo heterogêneo de bastonetes Gram-positivo, catalase-negativo, não formadores de esporos, que são componentes da microbiota indígena intestinal de homens e outros animais, além de serem importantes bactérias produtoras de ácido láctico (Hammes & Vogel, 1995 e Rush *et al.*, 1997).

Em geral, *Lactobacillus* não estão envolvidos em infecções gástricas e intestinais, não sendo organismos patogênicos; sendo consideradas as bactérias produtoras de ácido láctico mais importantes dentro do grupo GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro – *Generally Recognized as Safe*), com grande importância industrial (Lee & Salminen, 1995; Gomes & Malcata, 1999 e Singh *et al.*, 2009).

Em alimentos, a maioria dos *Lactobacillus* é tipicamente microaerófila, mas há espécies anaeróbias facultativas, principalmente

nos organismos de humanos (Jay, 1996).

Axelsson (2004) relatou que há mais de oitenta espécies identificadas e reconhecidas de *Lactobacillus*, já desconsiderando as cinco espécies que foram reclassificadas como pertencentes ao gênero *Weissella*. Essa classificação só foi possível devido ao avanço das técnicas de biologia molecular.

De acordo com Hammes e Vogel (1995), Jay (1996), Buriti e Saad (2007) e Bernardeu *et al.* (2008), os *Lactobacillus* são classificados em três grupos, baseado em suas características fermentativas:

- homofermentativos obrigatórios: convertem hexoses em ácido láctico via Embden-Meyerhof Parnas, sendo incapazes de utilizar as pentoses, como por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus salivarius*;
- heterofermentativos facultativos: fermentam hexoses em ácido láctico e, no caso de algumas espécies e sob certas condições, em ácidos láctico, acético, fórmico e etanol, sendo capazes de fermentar pentoses em ácidos láctico e acético, por exemplo, o grupo grupo *Lactobacillus casei* no qual está incluído o *Lactobacillus rhamnosus*, objeto deste estudo;
- heterofermentativos obrigatórios: utilizam hexoses para obter ácidos láctico e acético, etanol e dióxido de carbono, e pentoses para obter ácidos láctico e acético; como, o *Lactobacillus fermentum* objeto deste estudo.

O grande número de espécies neste gênero e suas similaridades fenotípicas fizeram com que ocorressem algumas vezes erros de identificação. Para evitar

esses problemas, várias formas de identificação foram propostas como, por exemplo, baseadas em características bioquímicas e fisiológicas, além da identificação molecular comparando a sequência 16S do rRNA (Hammes & Vogel, 1995).

4.3.1. *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus faz parte do grupo *Lactobacillus casei*, o qual também compreende *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*. O grupo *Lactobacillus casei* possui grande relevância na indústria farmacêutica e alimentícia, pelo fato de promoverem a saúde humana. São encontrados em produtos alimentícios, mas também fazem parte da microbiota humana, presentes no trato gastrintestinal, boca e vagina (Klein *et al.*, 1998; Buriti & Saad, 2007).

A diferenciação entre as espécies do grupo *Lactobacillus casei* não pode ser apenas por perfis fermentativos, pois as três espécies apresentam perfis muito similares; a mesma pode ser realizada por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (Ward & Timmins, 1999). A identificação de *Lactobacillus rhamnosus* ocorreu por identificação baseada no sistema DNA-DNA, e foi uma identificação fácil, pois sua célula

contém ramnose, e é uma das poucas espécies capazes de fermentá-la (Klein *et al.*, 1998).

Collins *et al.* (1989) descreveram *Lactobacillus rhamnosus* como microrganismos com células em forma de bastonetes, que podem ocorrer em cadeias ou isolados, heterofermentativos facultativos e produtores de ácido láctico, ou seja, possuem capacidade de fermentar o leite.

Amostras de *Lactobacillus rhamnosus* possuem efeitos protetores comprovados contra infecções por *Escherichia coli* (Saito, Watanabe & Tado, 1980). Além disso, o *Lactobacillus rhamnosus* quando ingerido em concentrações adequadas, promove benefícios à saúde da mulher, pois a vagina tem o mesmo em sua microbiota atuando no combate aos microrganismos patogênicos, como por exemplo *Escherichia coli* e *Gardnerella vaginalis*. (Reid *et al.*, 2003).

No Quadro 5 estão apresentadas as principais linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* utilizadas em alimentos, com benefícios comprovados cientificamente.

Quadro 5: Linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* utilizadas na fermentação de alimentos e seus respectivos benefícios à saúde humana

Linhagem	Produtor	Origem	Benefícios
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 3103)	Valio, Finlândia	Intestino	Coloniza temporariamente o intestino, reduz a diarreia por antibióticos em crianças, imunomodulação, redução de enzimas procarcinogênicas
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech, Canadá/ Chr Hansen, Dinamarca	Urogenital	Restaura a microbiota urogenital, reduzindo riscos na UTI e evitando infecções por bactérias e leveduras na vagina; adere às células uroepiteliais inibindo o crescimento e adesão de uropatógenos.
<i>L. rhamnosus</i> DR20/HN0001 com <i>B. lactis</i> DR10	Danisco, Dinamarca	-	Aumenta a imunidade de idosos
<i>L. rhamnosus</i> GR-1 com <i>L. reuteri</i> RC-14	Chr Hansen, Dinamarca	-	Melhora a saúde intestinal e a saúde urogenital feminina

Fonte: adaptado de Saarela *et al.*, 2000 e Yeung *et al.*, 2002.

4.3.2. *Lactobacillus fermentum*

A primeira descrição de *Lactobacillus fermentum* realizada por Beijerinck em 1901, como uma espécie heterofermentativa de *Lactobacillus* que pode ser isolado de produtos lácteos, pães, material de fermentação de plantas, boca e fezes de humanos (Hammes & Vogel, 1995; Dellaglio, Torriani & Felis, 2004).

Grande quantidade de *Lactobacillus fermentum* é isolada de leites fermentados tradicionais, como por exemplo, leites fermentados da China, do Tibete, da Mongólia e do Sudão (Abdelgadir *et al.*, 2001 e Bao *et al.*, 2010).

Bao *et al.* (2010) verificaram o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus fermentum* isolados de leites fermentados tradicionais, mas seriam necessárias pesquisas *in vivo*. Estes testes *in vitro* compreendem tolerância a condições de baixo pH, ao trânsito intestinal, à bile; além da atividade de agregação, como por exemplo, habilidade de combater agentes patogênicos, de instalar na microbiota transitória e atividade antibacteriana.

Fons *et al.* (1997) descreveram que *Lactobacillus fermentum* são as principais espécies de *Lactobacillus* spp. heterofermentativos existentes no intestino humano.

Martín *et al.* (2005) descreveram que amostras de *Lactobacillus fermentum* foram isoladas de leite humano e possuíam propriedades probióticas, como sobrevivência no trato gastrointestinal, adesão às células intestinais e atividade antimicrobiana.

Pereira *et al.* (2003) relataram que espécies de *Lactobacillus fermentum* são microrganismos normalmente presentes na microbiota humana, com habilidade de aderir à células epiteliais. Segundo Morita *et al.* (1997), *Lactobacillus fermentum* é uma das

mais importantes bactérias produtoras de ácido láctico presentes na microbiota do intestino humano, trazendo benefícios ao hospedeiro. Além disso, é um dos microrganismos predominantes no intestino humano e na vagina, atuando também como regulador da microbiota (Reid *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005).

No Quadro 6 estão apresentadas as principais linhagens de *Lactobacillus fermentum* utilizadas em alimentos, com benefícios comprovados cientificamente.

Quadro 6: Linhagens de *Lactobacillus fermentum* utilizadas na fermentação de alimentos e seus respectivos benefícios à saúde humana

Linhagem	Produtor	Origem	Benefícios
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech, Canadá/ Chr Hansen, Dinamarca	Urogenital	Restaura a microbiota urogenital
<i>L. fermentum</i> 737/ 104R	Universidade de Göteborg, Suécia	TGI Animal	Aumenta a imunidade contra colonização de patógenos no TGI; coloniza o intestino por diversas semanas

Fonte: Adaptado de Saarela *et al.*, 2000 e Yeung *et al.*, 2002.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), durante o período de julho a dezembro de 2010. Os Laboratórios que foram utilizados são: laboratório de análises físico-químicas, laboratório de análises microbiológicas e laboratório de análise sensorial.

5.1. Delineamento experimental

Foram elaborados dois tipos de leites fermentados, um contendo apenas a cultura de *Lactobacillus rhamnosus* e um segundo contendo *Lactobacillus fermentum*.

Após a produção, os leites fermentados foram estocados sob refrigeração entre 8 a 10°C e submetidos às análises físico-químicas e microbiológicas com 1, 15, 30 e 45 dias de estocagem. Dessa forma, a pesquisa teve um delineamento fatorial 2x4 (dois tipos de leites

fermentados e quatro tempos de análise). Os produtos elaborados também foram submetidos à análise sensorial aos 15 e 60 dias de estocagem entre 8 e 10°C; neste caso, com um delineamento 2x2 (dois tipos de leites fermentados e dois momentos de análise).

5.2. Controle de qualidade do leite em pó desnatado

A utilização do leite em pó desnatado pode ser justificada pela associação da imagem positiva da ingestão de leite desnatado com as características probióticas das culturas utilizadas.

O objetivo da verificação da qualidade microbiológica e físico-química dos lotes de leite em pó foi caracterizar o leite utilizado e garantir, conseqüentemente, o controle de qualidade da produção dos leites fermentados. Foram utilizados três lotes de leite em pó desnatado da marca Molico (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para o controle microbiológico foram realizadas as análises de contagem global de microrganismos mesófilos aeróbios (UFC/ml), contagem global de microrganismos termotóxicos (UFC/ml), pesquisas de coliformes totais e fecais (NMP/ml), *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp. recomendadas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leite em pó (Brasil, 1996), além da contagem de bolores e leveduras. Todos os procedimentos seguiram a metodologia descrita em Métodos Analíticos Oficiais para

Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (Brasil, 2003). Para o controle físico-químico, foram feitas as seguintes análises: determinações de pH, acidez titulável; e teores percentuais de gordura, proteína, extrato seco total, extrato seco desengordurado (Brasil, 2006).

5.3 Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído e tratado termicamente

A reconstituição do leite em pó foi realizada a 10% em água destilada, adicionado de sacarose a 8%. Após reconstituição o leite foi submetido a um tratamento térmico a 110°C por 10 minutos. Em seguida, foi feito o plaqueamento em meio MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, United States), em duplicata, da diluição 10⁰ deste leite em pó desnatado reconstituído a 10% e adicionado de 8% de sacarose e tratado termicamente.

5.4. Microrganismos

Foram utilizadas duas amostras de bactérias produtoras de ácido láctico: *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*, isoladas previamente de queijos de coalho artesanal e industrializado, produzido em Pernambuco, Brasil, identificadas por análise de restrição enzimática de DNA ribossomal e avaliadas quanto a propriedades probióticas (sensibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista *in vitro*) (Guedes Neto, 2004).

Para garantir que as culturas avaliadas estariam puras, foi realizado o teste de

Gram para ambos, e os resultados podem ser vistos nos anexos 1 e 2, sendo o primeiro o *Lactobacillus rhamnosus* e o segundo o *Lactobacillus fermentum*.

5.5. Curvas de fermentação/crescimento

A curva de fermentação foi obtida por meio das determinações do pH, da acidez titulável e da enumeração de bactérias produtoras de ácido láctico (UFC/ml) em meio ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, United States) nos intervalos de tempo de 2 horas desde o tempo zero (adição do inóculo) até a coagulação dos leites desnatados adicionados de *Lactobacillus fermentum* (leite LF) e *Lactobacillus rhamnosus* (leite LR).

O tempo de fermentação também foi determinado durante a curva de fermentação, sendo que o momento inicial foi a adição do inóculo ao leite e como momento final a formação do coágulo.

5.6. Preparo dos leites fermentados

Para a elaboração dos leites fermentados, 100 µL das culturas congeladas de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus* foram transferidos para tubos de ensaio com tampa contendo 5mL de Caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, United States). Estes tubos contendo as culturas de *Lactobacillus fermentum* (Anexo 3) e *Lactobacillus rhamnosus* (Anexo 4) foram incubados a 37°C ± 2°C por 24 horas, sendo esse procedimento repetido três vezes para garantir a ativação das culturas.

Após a ativação, 3% de cada cultura foram inoculados em recipientes contendo leite desnatado reconstituído a 10%, acrescido de sacarose a 8%, tratado termicamente a 110°C por 10 minutos e resfriado a 37°C. Esses recipientes contendo leite, sacarose e adicionados de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus* foram incubados a 37°C ± 2°C pelo tempo necessário até a coagulação do leite (Anexo 5 e Anexo 6).

Esses dois produtos fermentados constituíram de inóculo para a elaboração dos respectivos leites fermentados. Os inóculos foram adicionados em concentração igual a 3% em recipientes de 200 ml e 500 ml contendo o leite em pó reconstituído a 10%, adicionado de sacarose a 8%, tratado termicamente a 110°C por 10 minutos e resfriado a 37°C. Os leites adicionados com os inóculos foram incubados a 37°C ± 2°C até a coagulação. Ao término da coagulação os recipientes foram armazenados sob refrigeração entre 8 e 10°C. Os recipientes menores foram utilizados para análises microbiológicas e físico-químicas e os maiores para as análises sensoriais, permitindo, assim, que conteúdos de cada frasco fossem utilizados apenas em seu momento de análise.

Esse processo foi feito para produzir dois leites fermentados a partir das culturas de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*.

5.7. Análises laboratoriais dos leites fermentados

5.7.1 Avaliação físico-química dos leites fermentados

As análises foram realizadas nos dias 1, 15, 30 e 45 dias de estocagem dos leites fermentados sob refrigeração a 8-10°C em refrigerador (Ormifrio Ltda GCI004, Sabará, Minas Gerais, Brasil). A determinação da acidez titulável, expressa em gramas de ácido láctico por 100 gramas de produto, foi realizada de acordo com a norma IDF (1991), de acordo com o RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007). A medida de pH foi determinada por meio do pHmetro digital de bancada (mPA-210, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O teor percentual de gordura foi obtido pelo método de Gerber (Brasil, 2005). Os teores percentuais de umidade e extrato seco total (EST) foram determinados na estufa (Biomatic, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) e balança (SHIMADZU AY220, São Paulo, SP, 37 Brasil) (Brasil, 2006). O teor percentual de proteínas foi determinado pelo método Micro-Kjedahl, no equipamento TECNAL (TE012, Piracicaba, São Paulo, Brasil), segundo Brasil (2006).

5.7.2. Avaliação microbiológica dos leites fermentados

As análises foram realizadas nos dias um, 15, 30 e 45 dias de estocagem dos leites fermentados sob refrigeração a 8 – 10°C.

5.7.2.1. Enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico

As contagens dos microrganismos foram realizadas a partir de diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} dos leites fermentados produzidos, em salina peptonada (0,85% de NaCl - Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil - e 0,1% de peptona bacteriológica - HiMedia, Mumbai, India). Posteriormente, alíquotas de 0,1ml das diluições selecionadas foram espalhadas sobre o ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, United States) e incubadas sob aerobiose. A temperatura de incubação para *Lactobacillus fermentum* e para *Lactobacillus rhamnosus* foi $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Em seguida, e nesse período, a enumeração dos microrganismos foi feita por meio da contagem do número de colônias formadas nas placas, sendo este número multiplicado por 10 e também pelo inverso da diluição (adaptado de IDF, 1988).

5.7.2.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

As pesquisas de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas pelo método do Número Mais Provável (NMP) (Brasil, 2003). No teste presuntivo, as diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} foram inoculadas em triplicata em tubos contendo caldo Verde Brilhante (HiMedia, Mumbai, India) e tubos de Durhan invertidos. Estes tubos foram incubados a 36°C por 48 horas. A identificação da presença de gás nos tubos de Durhan indica resultado positivo e por isso, requer a realização do teste confirmatório em ágar Levine para coliformes totais (30°C) (IDF,

1985) e caldo EC para coliformes fecais (45°) (Brasil, 2003).

5.7.2.3. Pesquisa de bolores e leveduras

A pesquisa de bolores e leveduras foi feita de acordo com a Instrução Normativa (IN) 62, Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal (Brasil, 2003).

Em ágar batata dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, United States) acidificado a pH 3,5, foram inoculados 0,1 ml das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} e espalhados com o auxílio de alças de Drigalski.

As placas foram incubadas, sem inverter, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente), sem inverter por sete dias.

5.8. Avaliação sensorial dos leites fermentados

A avaliação sensorial pode ser realizada em diferentes situações pelas empresas ou órgãos de pesquisa, dentre as quais destacam a preferência do consumidor, classificação dos produtos, correlação entre os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e da avaliação sensorial e no desenvolvimento de novos produtos, o qual é a situação desta pesquisa (Chaves, 1998).

A análise sensorial foi realizada em dois momentos, 15 e 60 dias de estocagem dos leites fermentados a 8- 10°C . Em cada momento, foram analisados sensorialmente dois produtos diferentes (leites fermentados produzidos com as duas culturas diferentes). A equipe

utilizada em cada momento de análise sensorial foi de provadores não treinados, composta por 30 estudantes, funcionários e professores da Escola de Veterinária da UFMG. Os provadores, para realizar a avaliação sensorial, deveriam possuir o hábito de consumir leites fermentados, sendo potenciais consumidores e compradores dos produtos em teste.

A avaliação sensorial desta pesquisa foi realizada com o objetivo de verificar a aceitação dos consumidores em relação ao produto desenvolvido, e se haveria algum que seria mais aceito.

As amostras receberam codificações com sequencias aleatórias de três dígitos e servidas aos provadores em cabines individuais, em porções de 20ml em copos descartáveis de plástico branco, a uma temperatura igual a 8- 10°C . E as duas amostras foram oferecidas simultaneamente ao provador.

Os provadores receberam uma ficha (Anexo 7) contendo uma escala não estruturada formada por uma linha inteira, ancorada nos extremos pelos números 0 e 10 sobre a qual marcaram um X, expressando o grau de aceitação do produto. A interpretação destes resultados foi realizada com uma régua de 10cm colocada sobre a linha para quantificar o grau de aceitação (Anzaldua-Morales, 1994). A ficha também continha, além disso, uma escala hedônica de cinco pontos, que permitia que os provadores qualificassem o quanto gostaram ou desgostaram, em relação à avaliação global do produto. Foram atribuídos pontos para os graus de aceitação (1 =

Detestei, 2 = Não gostei, 3 = Não gostei nem desgostei, 4 = Gostei, 5 = Adorei) para que os dados fossem tratados estatisticamente. Além da ficha recebiam também duas cópias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 8), na qual assinavam as cópias e ficavam com uma, para garantir que o provador tomasse conhecimento da pesquisa.

O teste de escala hedônica é um teste afetivo, no qual a pessoa indica sua aceitação em relação ao produto e, em geral, é realizado com potenciais consumidores (Chaves, 1998). Anzaldúa-Morales (1994) define a escala hedônica como uma forma de mensurar o nível de satisfação do consumidor em relação ao produto avaliado, e a mesma pode ser de 3, 5 ou 9 pontos, sempre variando entre o gostar e o não gostar, passando pelo não gostei nem desgostei, em seu ponto médio. A escala hedônica também pode ser representada por meios gráficos, assim como nesta pesquisa.

A realização das análises sensoriais deste trabalho foi aprovada no dia 02 de junho de 2010 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, parecer número ETIC 155-2010.

5.9. Análise Estatística

A análise estatística do experimento foi o delineamento em blocos ao acaso com arranjo em parcelas subdivididas, na qual cada lote de leite em pó desnatado

representou um bloco, os dois tratamentos (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*) foram considerados parcelas, sendo as subparcelas os tempos (um, 15, 30 e 45 dias de estocagem sob refrigeração) em que foram realizadas as análises físico-químicas e microbiológicas e os dois tempos das análises sensoriais (15 e 60 dias de estocagem sob refrigeração). Foram realizadas três repetições do experimento.

Para a comparação de médias dos tratamentos, considerando a enumeração de bactérias produtoras de ácido láctico (UFC/g) e análises físico-químicas utilizou-se a análise estatística paramétrica e foi aplicado o teste de Student-Newman-Keuls, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

Os resultados da avaliação sensorial foram submetidos às análises estatísticas não paramétricas, pelos testes de Wilcoxon em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Controle de qualidade do leite em pó desnatado

Os dados de acidez titulável e da composição físico-química dos três lotes de leite em pó desnatados utilizados durante as três repetições do experimento estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Teores percentuais médios de acidez titulável e componentes físico-químicos dos três lotes de leite em pó desnatado

Parâmetro (%)	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Gordura	0	0	0
Umidade	3,77	3,66	3,95
Proteína	32,87	33,44	33,12
Extrato Seco Total	96,23	96,34	96,05
Acidez*	1,50	1,45	1,49

* g de ácido láctico/100g

Os resultados encontrados para o teor de gordura demonstram que todos os três lotes de leite em pó encontram-se dentro dos padrões estabelecidos no RTIQ de leite em pó (Brasil, 1996), tendo em vista que apresentaram valores inferiores a 1,5%. A partir destes resultados, tem-se a indicação de que o processamento industrial e a padronização dos três lotes de leite em pó foram realizados corretamente, garantindo que os mesmos sejam considerados ideais para a produção de leites fermentados desnatados.

Como pode ser verificado na Tabela 1, os resultados percentuais de umidade também se encontram dentro dos padrões preconizados pela legislação brasileira para leite em pó (Brasil, 2006), a qual estabelece o limite de 4,0% de umidade. Apesar de o RTIQ de leites fermentados não mencionar diretamente os parâmetros para Extrato Seco Total (EST), o mesmo pode ser discutido com base no parâmetro de umidade, tendo em vista que o teor percentual de EST é igual à todos os constituintes do alimento (representado pelo número 100) exceto a umidade. Portanto, para leite em pó desnatado, esse valor seria de no mínimo 96%. Com base nessa hipótese, pode-se dizer

que o leite em pó utilizado para a formulação dos leites fermentados estava de acordo com o RTIQ de leite em pó, pois todos os lotes analisados apresentam valores de EST superiores a 96% (Brasil, 2006).

Em relação à acidez titulável, os valores encontrados estão expressos de forma diferente da estabelecida na legislação brasileira (Brasil, 1996), devido à diferença de técnicas utilizadas (Brasil, 2006). Apesar dessa diferença, todos os leites apresentaram resultados dentro dos padrões, pois a legislação estabelece que sejam utilizados no máximo 18ml de NaOH 0,1N para cada 10 gramas de amostra e, na análise realizada, foram utilizados no máximo 9 ml para cada 5 gramas de amostra.

Os parâmetros de proteína não podem ser discutidos com base no RTIQ de leite em pó (Brasil, 1996), pois não possuem padrões estabelecidos. Entretanto, os resultados desse parâmetro em conjunto com os demais (extrato seco total, acidez titulável, umidade e gordura) proporciona a verificação de que a composição físico-química dos três lotes de leite em pó analisados é semelhante, indicando padronização do leite em pó desnatado

que foi utilizado no experimento. Uma possível falta de padronização poderia alterar o metabolismo dos microrganismos, os resultados físico-químicos, sensoriais e microbiológicos dos leites fermentados produzidos a partir dos mesmos.

Nas análises microbiológicas realizadas para os três lotes de leite em pó, foi verificado ausência de bolores e leveduras, microrganismos mesófilos aeróbios; microrganismos termofílicos, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. Para coliformes totais e fecais o resultado foi menor que 3,0 NMP/ml. Estes resultados superam os padrões estabelecidos pela legislação brasileira para leite em pó (Brasil, 1996) e, portanto, apresentaram qualidade microbiológica adequada.

6.2. Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído

O crescimento de colônias de microrganismos em meio MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, United States) plaqueado na diluição 10^0 não

foi observado, demonstrando que o tratamento térmico aplicado (110°C por 10 minutos, seguido de resfriamento a 37°C) foi adequado para garantir a esterilidade dos leites em pó desnatados reconstituídos a 10%, adoçado a 8%.

6.3. Curva de Fermentação / Crescimento

6.3.1. pH

A Figura 1 apresenta os resultados médios de duas repetições da medida dos valores de pH a cada duas horas, partindo do tempo zero (adição do inóculo) até a coagulação completa, durante a incubação a 37°C do leites desnatados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

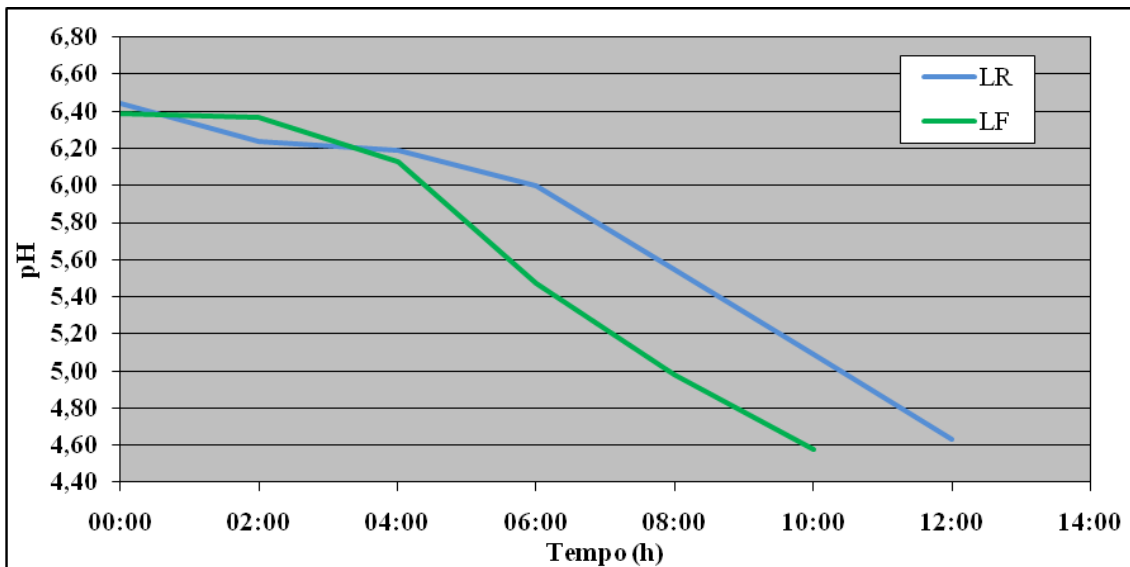


Figura 1: Médias de duas repetições de pH durante a fermentação de leites fermentados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Lactobacillus fermentum* (LF).

O final da fermentação foi baseado na formação do coágulo, com o desprendimento do mesmo, como pode ser observado nos Anexos 5 e 6. Pode-se verificar que a formação do coágulo coincidiu com o ponto isoelétrico da caseína, ou seja, pH em torno de 4,6 (Fennema, 1996).

Avaliando as variações de pH (Figura 1), percebe-se que até o tempo de quatro horas o decréscimo foi pequeno e, a partir deste tempo, houve uma queda brusca no pH para o leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*. Para o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, o pH começou a reduzir bastante a partir das seis horas de incubação à $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Observa-se também, que o pH inicial e final de ambos os leites fermentados foram próximos, o pH médio inicial do leite fermentado por *Lactobacillus fermentum* foi de 6,39 e o final 4,58;

enquanto que para o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, o pH médio inicial é de 6,44 e o final 4,63.

Em relação ao tempo de fermentação (Anexo 9), leite fermentado por *Lactobacillus fermentum* apresentou duas horas a menos de fermentação quando comparado ao leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*. Considerando a escassez de trabalhos avaliando a fermentação do leite com ambos os microrganismos, esses resultados possuem grande relevância para avaliar o comportamento de tais microrganismos durante todo o tempo de fermentação em leites desnatados.

O baixo tempo de fermentação possui alto valor para a indústria de processamento de leites fermentados, uma vez que um menor tempo de fermentação poderá resultar em um maior volume de produção; portanto esses dados apresentam grande

relevância para a indústria de laticínios e derivados.

6.3.2. Acidez Titulável

A Figura 2 apresenta os resultados de acidez titulável durante a fermentação de leites desnatados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

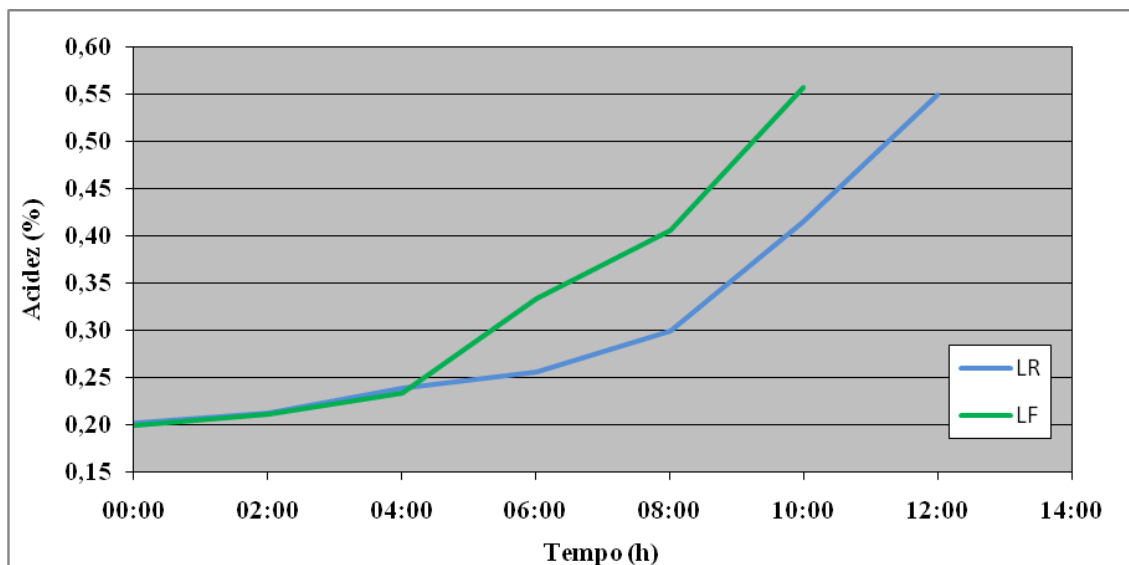


Figura 2: Médias de duas repetições de acidez titulável (%) durante a fermentação de leites fermentados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Lactobacillus fermentum* (LF).

A Figura 2 demonstra que, assim como o pH apresentou-se inicialmente estável, a acidez também. Isso demonstra que os dois parâmetros estão relacionados na produção de leites fermentados, pois é esperado que com a redução do pH ocorresse um aumento da acidez.

Os valores iniciais e finais de acidez titulável de ambos os leites fermentados foram próximos, sendo para o leite fermentado por *Lactobacillus fermentum* 0,19g de ácido láctico/100 g de produto inicialmente e 0,58 g de ácido láctico/100 g de produto no final da fermentação, e para o *Lactobacillus rhamnosus* a acidez titulável inicial foi de 0,20 g de ácido láctico/100 g de

produto e a final, 0,55 g de ácido láctico/100 g de produto.

Na Figura 2, verifica-se que todos os leites fermentados apresentaram valores acidez titulável inferiores a 0,60%, que é o valor mínimo oficial estabelecido pela legislação brasileira para leites fermentados (Brasil, 2007). Apesar de os valores serem menores que 0,60%, pode-se dizer que os mesmos estão bem próximos da referência, pois para o leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*, a diferença foi de 0,02% e para o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* a diferença foi de 0,05%. Vale ressaltar que os valores estabelecidos no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) são baseados

em culturas comerciais, as quais não foram utilizadas neste trabalho, pois conforme já mencionado anteriormente, as culturas foram isoladas de produtos lácteos artesanais brasileiros.

Viegas *et al.* (2010) verificou em sua pesquisa com bactérias também isoladas de queijos de coalho artesanais, diferença semelhante entre a acidez titulável durante a fermentação. Os valores encontrados foram mais baixos que aqueles postulados pela legislação brasileira (Brasil, 2007), variando entre 0,32% e 0,47%, entre os leites fermentados elaborados com os microrganismos testados. Os microrganismos utilizados foram *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa*, isolados ou em associação,

acrescidos ou não de concentrado proteico de soro.

Oliveira *et al.* (2009) verificaram que durante a fermentação de leites fermentados contendo *Lactobacillus rhamnosus* em associação com *Streptococcus thermophilus* a acidez também teve um aumento com o passar do tempo.

6.3.3. Enumeração das bactérias produtoras de ácido láctico

Na Figura 3 podem ser observados valores que permitem acompanhar o crescimento dos microrganismos *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* durante o processo de fermentação de leites desnatados esterilizados.

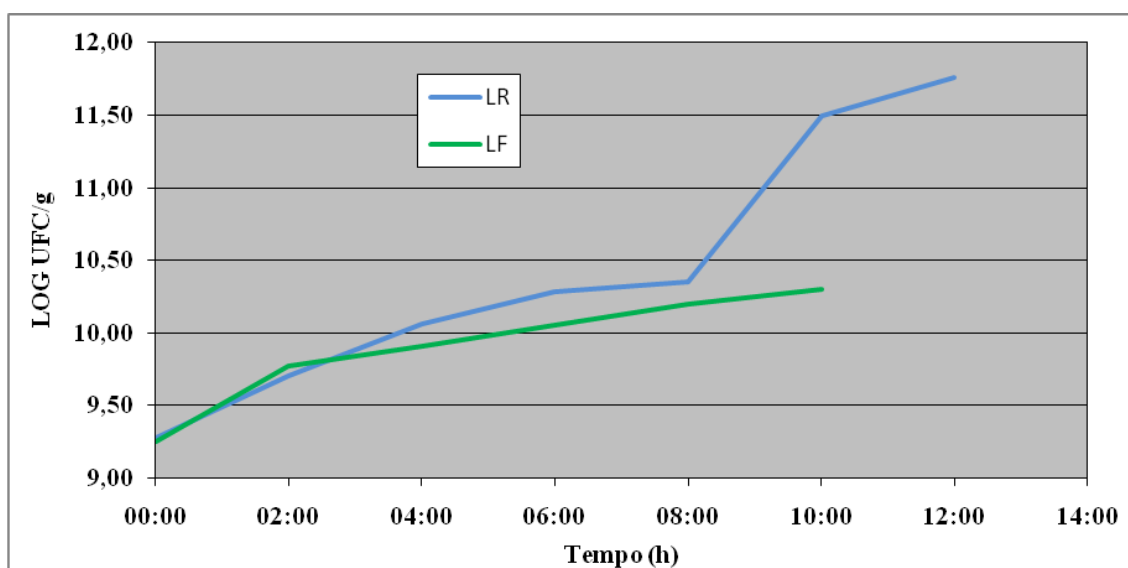


Figura 3: Médias de duas repetições das contagens (log UFC/g) durante a fermentação de leites fermentados esterilizados adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Lactobacillus fermentum* (LF).

Segundo Shah (2000) e Hassan e Frank (2001), o crescimento de espécies probióticas de *Lactobacillus* e outros microrganismos em leites, quando os

mesmos estão em culturas puras, como é o caso deste trabalho, é lento. Por isso, até o tempo de oito horas após a adição do inóculo inicial, a curva para a

fermentação por *Lactobacillus rhamnosus* se manteve mais constante e depois desse tempo ocorreu um pico de crescimento. No caso da fermentação por *Lactobacillus fermentum*, o crescimento é praticamente constante em todo o tempo até a coagulação.

Ao comparar os resultados de acidez titulável e da enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico, verifica-se que *Lactobacillus rhamnosus* foi mais resistente ao ambiente mais ácido em relação a *Lactobacillus fermentum*, pois seu crescimento possuiu um pico em uma acidez mais alta.

Os dois leites fermentados apresentaram após o fim da fermentação contagens de bactérias em valores superiores ao mínimo estabelecido no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007). Essa legislação estabelece como valor mínimo de 10^6 UFC/g para leites fermentados. Contagens mais elevadas de microrganismos probióticos nos

produtos finais são desejadas no intuito de garantir que quantidades de bactérias viáveis sejam mantidas durante todo o tempo de estocagem. Segundo Hekmat, Soltani e Reid (2009), *Lactobacillus rhamnosus* apresentou contagens entre 10^7 e 10^{10} UFC/g na fermentação de leite, garantindo a contagem adequada durante todo o tempo de estocagem. Para *Lactobacillus fermentum*, há uma escassez de trabalhos, não sendo possível uma comparação, tornando os dados deste trabalho bastante relevantes para pesquisas futuras.

6.4. Avaliação físico-química dos leites fermentados

6.4.1. pH

A Tabela 2 apresenta os resultados de pH nos tempos um, 15, 30 e 45 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C elaborados com as culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

Tabela 2: Resultados médios percentuais de três repetições pH de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração entre 8 a 10 °C, durante 45 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias				Médias
	1	15	30	45	
LR	4,68	4,43	4,13	4,14	4,35
LF	4,63	4,49	4,19	4,18	4,37

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Dados da Tabela 2 demonstram que não houve diferença significativa ($P>0,05$) para os valores de pH, ou seja, as variações encontradas nas medições de pH a cada tempo de análise e para cada

tipo de leite fermentado não foram diferentes durante os 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C.

Não é possível discutir os resultados de pH com base na legislação brasileira, pois o RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) não estabelece parâmetros para essa análise.

Donkor *et al.* (2006) verificaram que com a estocagem, mesmo em refrigeração controlada, o pH de leites fermentados sofre um declínio, devido a maior produção de ácido láctico pelos microrganismos adicionados ao leite e que essa redução de pH pode afetar ou não a viabilidade das bactérias probióticas produtoras de ácido láctico.

Viegas *et al.* (2010) observaram que durante 40 dias de estocagem de leites

fermentados produzidos com diferentes microrganismos produtores de ácido láctico, o pH também decresceu.

Entre os dois leites fermentados avaliados o que apresentou a menor média de pH foi o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*.

6.4.2. Acidez Titulável

A Tabela 3 apresenta os resultados de acidez titulável nos tempos 1, 15, 30 e 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C elaborados com as culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

Tabela 3: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de acidez titulável de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração entre 8 e 10°C, durante 45 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias				Médias
	1	15	30	45	
LR	0,65	0,69	0,93	1,03	0,82
LF	0,60	0,66	0,91	1,06	0,81

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Os valores de acidez titulável estavam de acordo com o preconizado no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), o qual estabelece que os limites máximo e mínimo sejam 0,6 e 2,0g de ácido láctico por 100g de produto. Apesar de haver diferenças entre os valores encontrados, a mesma não é significativa estatisticamente.

O comportamento da acidez também está dentro do esperado, ou seja, com o passar dos dias, a mesma aumenta, pois

mesmo após o término da coagulação os microrganismos não pararam de fermentar o leite. Isso foi observado pelo fato de que entre os tempos de análise sempre havia nova coagulação. Além disso, o comportamento é relacionado com o pH, pois conforme já foi observado, o pH diminuiu com os dias, o que indica que o leite ficou mais ácido.

Na análise de acidez titulável, o leite fermentado por *Lactobacillus*

rhamnosus apresentou maior média, confirmando o que foi mencionado anteriormente na análise de pH; e o leite fermentado por *Lactobacillus fermentum* apresentou menor média, também em acordo com a análise de pH.

Donkor (2006) e Viegas *et al.*(2010) também verificaram aumento na acidez titulável durante os 40 dias de estocagem de leites fermentados elaborados com *Bifidobacterium lactis*,

Lactobacillus paracasei, *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa*, com ou sem CPS, assim como foi verificado no presente trabalho.

6.4.3. Teor de proteína

A Tabela 4 apresenta os resultados de teor de proteína nos tempos 1, 15, 30 e 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C elaborados com as culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

Tabela 4: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de proteína de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração entre 8 e 10°C, durante 45 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias				Médias
	1	15	30	45	
LR	3,56	3,45	3,29	3,22	3,38
LF	3,52	3,43	3,30	3,25	3,38

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Dados da Tabela 4 mostram que não houve diferença entre os tempos de análise e os tipos de microrganismo utilizado para a fermentação em relação ao valor proteico. Assim como não há diferença ($P > 0,05$) entre as médias dos 45 dias. Isso demonstra que, embora haja diferença entre os percentuais de proteína entre os leites fermentados produzidos, essas variações não são significativas.

Com base nos requisitos estabelecidos pela legislação brasileira para leites fermentados, RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), a qual determina que o mínimo de proteína é de 2,9%. Os leites fermentados

produzidos atendem tal legislação em todos os tempos de análise, durante os 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C.

Viegas *et al.* (2010) verificaram que os leites fermentados sem o acréscimo de CPS apresentaram variações em seus teores proteicos, não tendo sempre um aumento ou redução do mesmo, havendo picos de proteína precedidos de aumento com posterior redução no teor.

6.4.4. Teor de gordura

Nas três repetições de teor de gordura nos leites fermentados, os mesmos

apresentaram zero por cento de gordura durante os tempos de estocagem (45 dias) sob refrigeração a 8-10°C. Esses resultados estão em consonância com o tipo de leite em pó utilizado no processo de fabricação dos leites fermentados, o leite em pó desnatado, que também apresentou zero por cento de gordura em sua análise. Além disso, os resultados estão de acordo com os padrões estabelecidos no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), o qual determina que a porcentagem máxima

de gordura em leites fermentados desnatados é no máximo 0,5% ou 0,5g de gordura por 100g de produto.

6.4.5. Teor de umidade e extrato seco total

Dados da Tabela 5 apresenta os resultados de umidade nos tempos 1, 15, 30 e 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C elaborados com as culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

Tabela 5: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de umidade de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração a 8-10 °C, durante 45 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias				Médias
	1	15	30	45	
LR	82,60	83,26	83,90	84,85	83,65
LF	83,19	81,84	83,05	82,94	82,76

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Os valores de umidade apresentados na Tabela 5 indicam que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os 45 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C, isso significa que apesar das variações entre as porcentagens de umidade as mesmas foram similares durante toda a estocagem.

O RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) não estabelece padrões para as análises de umidade, não sendo possível, portanto, comparar os resultados. Observa-se que alguns laticínios fazem uso de aditivos que

reduzem a umidade e aumentam a quantidade de extrato seco total. Para garantir maior qualidade a esses produtos, seria necessário o estabelecimento de parâmetros pela legislação, de modo a garantir a uniformidade dos mesmos, facilitando a inspeção.

A Tabela 6 apresenta os resultados de extrato seco total nos tempos um, 15, 30 e 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 a 10°C elaborados com as culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

Tabela 6: Resultados médios percentuais de três repetições dos teores de extrato seco total de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração entre 8 e 10 °C, durante 45 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias				Médias
	1	15	30	45	
LR	17,40	16,74	16,10	15,15	16,35
LF	16,81	18,16	16,95	17,06	17,24

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Assim como nas análises umidade, não houve diferença ($P>0,05$) entre os 45 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C e os leites fermentados, demonstrando que mesmo com variações de porcentagens essas não foram suficientemente significativas. Além disso, o RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) não estabelece padrões para o extrato seco total, impossibilitando a comparação com valores oficiais.

6.5. Avaliação microbiológica dos leites fermentados

6.5.1. Enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico

A Tabela 7 apresenta as contagens totais das bactérias produtoras de ácido láctico nos tempos 1, 15, 30 e 45 dias de estocagem a 8-10°C de leites fermentados elaborados com as culturas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*.

Tabela 7: Contagens médias (UFC/g) em ágar MRS, de três repetições de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração a 8-10 °C, durante 45 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias				Médias
	1	15	30	45	
LR	$1,0 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{11}$	$9,6 \times 10^{10}$
LF	$5,4 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$	$8,3 \times 10^8$	$6,5 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Comparando os valores médios das três repetições das contagens (UFC/g) de bactérias produtoras de ácido láctico totais presentes nos leites fermentados não foi observado entre eles diferença significativa ($P>0,05$). Também não houve diferença ($P>0,05$) entre os valores médios das três repetições

dessas contagens durante os 45 dias de armazenamento e estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C (Tabela 7).

A legislação brasileira determina as contagens mínimas para microrganismos específicos em leites fermentados, as quais devem ser

cumpridas durante todo o período de validade do produto. Para leites fermentados, cuja fermentação ocorre a partir de uma ou várias bactérias produtoras de ácido láctico, a contagem mínima é definida. Portanto, esse valor de contagem, segundo a legislação é de 10^6 UFC/g.

Comparando os dados da Tabela 7 com a legislação, verifica-se que tanto o leite fermentado produzido pela fermentação de *Lactobacillus rhamnosus* quanto por *Lactobacillus fermentum* estão de acordo com a mesma, tendo em vista que as médias das contagens foram de $9,6 \times 10^{10}$ UFC/g para o *Lactobacillus rhamnosus* e $2,2 \times 10^{10}$ UFC/g para o *Lactobacillus fermentum*.

Ainda sobre essas contagens, elas não só estão cumprindo a legislação vigente para leites fermentados como superam a mesma, garantindo assim um produto de qualidade para o consumidor, com todos seus efeitos benéficos sustentados. Pois para que um produto seja considerado probiótico ele deve ter seus microrganismos em números viáveis durante todo o seu prazo de validade. Vários estudos vêm sendo realizados para determinar qual é essa quantidade ideal de microrganismos para garantir o seu efeito benéfico, com isso alguns autores sugerem que a quantidade mínima de bactérias por grama de leite fermentado deva ser de 10^6 UFC/g, sendo que a dose ingerida recomendada está em torno de 10^8 - 10^9 UFC (Rasic e Kurmann, 1983 citados por Gomes e Malcata, 1999).

Além disso, pode-se verificar que *Lactobacillus rhamnosus* sempre apresentou contagem maior durante os

45 dias quando comparado a *Lactobacillus fermentum*. Essa diferença na contagem pode ter ocorrido pelo fato de que a cultura de *Lactobacillus fermentum* estava há mais tempo sem ser ativada; enquanto a cultura de *Lactobacillus rhamnosus* havia sido ativada recentemente, há menos de seis meses de seu uso para este trabalho.

Realizando um paralelo comparativo entre os valores de acidez titulável e a enumeração dos microrganismos produtores de ácido láctico, verifica-se que, mesmo com o aumento da acidez, o número de microrganismos não reduziu significativamente, eles se mantiveram constantes durante o tempo de estocagem, demonstrando potencial tolerância dos mesmos aos níveis de acidez encontrados nos produtos durante a fermentação.

Hekmat, Soltani e Reid (2009) verificaram que durante a estocagem refrigerada de leites fermentados produzidos com *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus reuteri* associados, *Lactobacillus rhamnosus* se manteve mais viável durante o período, mantendo sempre contagens entre 10^7 e 10^8 UFC/g, resistindo sempre à elevação da acidez e redução do pH.

6.5.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

Nas três repetições de pesquisa de coliformes totais e termotolerantes nos leites fermentados, não foi observada a presença de gás em nenhum dos tubos contendo Caldo Verde Brilhante e tubos de Durham invertidos. Portanto apenas a prova presuntiva foi realizada nesta

análise. Esses resultados garantem que houve condições higiênicas sanitárias adequadas durante o processo de elaboração e armazenamento dos leites fermentados produzidos.

Além disso, esses resultados indicam ausência de coliformes totais e termotolerantes durante os 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C, garantindo qualidade microbiológica dentro do exigido pelo RTIQ de leites fermentados, o qual permite até duas amostras com contagens entre 10 e 100 UFC/g para coliformes totais, e até duas amostras com contagens menores que 3 até 10 UFC/g (Brasil, 2007).

6.5.3. Pesquisa de bolores e leveduras

Não se observou crescimento de colônias de bolores e leveduras nas placas, portanto os resultados indicam ausência dos mesmos em todos os leites fermentados durante os 45 dias estocados sob refrigeração entre 8 e

10°C. Isso demonstra que não houve contaminação ambiental ou por manipulação com esses microrganismos, garantindo qualidade microbiológica superior ao exigido pelo RTIQ de leites fermentados, o qual permite no máximo duas mostras com contagens entre 50 e 200 UFC/g (Brasil, 2007).

6.6. Avaliação sensorial dos leites fermentados

6.6.1. Teste de aceitação pela escala hedônica de cinco pontos

As medianas apresentadas na Tabela 8 representam os resultados das análises sensoriais dos leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* representados em forma de pontos atribuídos a cada degrau de aceitação (adorei, gostei, não gostei nem desgostei, não gostei, detestei) presente na escala hedônica de cinco pontos da ficha de análise sensorial.

Tabela 8: Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração entre 8 a 10 °C, durante 60 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias	
	15	60
LR	4,0 ^a	3,0 ^b
LF	4,0 ^a	3,0 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (P<0,05).

1- Detestei, 2- Não gostei, 3-Não gostei nem desgostei, 4-Gostei, 5-Adorei

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Os dados da Tabela 8 demonstram que não houve diferença (P>0,05)

significativa entre os dois tipos de leites fermentados produzidos, havendo

diferença ($P < 0,05$) apenas entre cada leite a cada momento de análise.

As notas atribuídas pelos provadores no dia 15 tiveram como mediana, em ambos os leites, 4, o que significa gostei; já no dia 60, as notas foram 3, significando não gostei nem desgostei. Essa diferença entre as notas pode ser explicada pelo fato de que com o passar do tempo os leites foram acidificando e o consumidor tem preferência por sabores mais suaves e menos ácidos de leites fermentados.

Além disso, verificou-se que a maior parte dos provadores associou o termo leite fermentado à marca comercial que utiliza a cultura *Lactobacillus casei*, indicando que os mesmos provavelmente utilizam esses produtos

como referência na avaliação sensorial. Isso foi observado nos comentários realizados pelos provadores durante a análise sensorial.

Com relação à análise sensorial, pode-se verificar que 60 dias pode ser um tempo longo para o prazo de validade, pois apesar dos provadores não gostaram nem desgostaram do leite neste prazo.

6.6.2. Teste de aceitação pela escala não estruturada

As medianas apresentadas na tabela 9 representam os resultados das análises sensoriais dos leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* representados em forma de escala não estruturada ancorada nos números 0 e 10.

Tabela 9: Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala não estruturada) dos leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, armazenados sob refrigeração entre 8 e 10 °C, durante 60 dias de estocagem

Leite fermentado	Dias	
	15	60
LR	6,87 ^{Aa}	4,90 ^{Ab}
LF	6,43 ^{Aa}	5,94 ^{Ba}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*

Os dados apresentados pela Tabela 9 demonstram que houve diferença ($P < 0,05$) entre os dois tempos de análise para o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, sendo que o mesmo comportamento não pôde ser observado para o *Lactobacillus fermentum*. Comparando os dois leites em cada tempo de análise, aos 15 dias

não houve diferença ($P > 0,05$) entre os mesmos; entretanto, aos 60 dias há diferença ($P < 0,05$).

Esses resultados não demonstram muita semelhança com a os apresentados na tabela anterior (Tabela 8), pois o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* apresentou diferença

($P < 0,05$) entre os tempos de análise, assim como na tabela anterior; por outro lado, o leite fermentado por *Lactobacillus fermentum* apresentou outro comportamento, mantendo-se sem diferença ($P > 0,05$) entre os tempos de análise.

As notas atribuídas pelos provadores apresentaram perfis diferentes com o tempo, pois aos 15 dias houve preferência pelo leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, em termos de valores numéricos de notas; entretanto, aos 60 dias a preferência foi pelo *Lactobacillus fermentum*.

Durante a análise das fichas sensoriais, verificou-se que os provadores referiam-se ao leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* aos 15 dias como um excelente leite, muito gostoso, muito similar ao de uma famosa marca, enquanto que aos 60 esse mesmo leite era referenciado como muito ácido, de sabor desagradável. Portanto, verificou-se que esse leite acidificou mais que o produzido por fermentação por *Lactobacillus fermentum*.

7. RESUMO DOS RESULTADOS

Todos os leites fermentados apresentaram contagens de microrganismos com valores superiores ao mínimo estabelecido no RTIQ de leites fermentados por *Lactobacillus* spp. (Brasil, 2007) e adequadas do ponto de vista probiótico.

Os leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram valores mais baixos de pH e, conseqüentemente, de

acidez titulável (%) mais altos ao final da fermentação.

Todos os parâmetros físico-químicos não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os tempos de análise e os leites fermentados.

Em todos os leites fermentados, as concentrações de bactérias produtoras de ácido láctico foram suficientes (médias acima de 10^8 UFC/g) para garantir prováveis efeitos probióticos, durante os 45 dias de estocagem sob refrigeração entre 8 e 10°C , sugerindo, também, que este tempo pode ser utilizado como prazo de validade para tais produtos.

Os resultados das análises microbiológicas, principalmente da pesquisa de coliformes totais e termotolerantes e bolores e leveduras, que indicaram valores adequados dos mesmos durante os 45 dias de refrigeração, garantindo a qualidade dos leites fermentados, possuindo a mesma superioridade exigida na legislação (Brasil, 2007).

Durante as análises sensoriais, os provadores sempre se referiam a um produto comercial fermentado por *Lactobacillus casei* ao avaliar o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* e, no teste de escala hedônica, não verificaram diferenças entre os dois leites. Como a segunda análise sensorial ocorreu aos 60 dias de estocagem, verificou-se que o mesmo é um prazo muito longo para estocagem, tendo em vista que a maioria dos avaliadores comentou sobre a alta acidez de ambos os leites.

8. CONCLUSÕES

É possível produzir leites fermentados com qualidade a partir de microrganismos isolados de produtos lácteos artesanais brasileiros, ou seja, as culturas lácticas *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* podem ser utilizadas para a produção de novos leites fermentados, os quais poderiam ter prazo de validade de 45 dias, quando armazenados a 8-10°C.

Leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* isolados de queijo de coalho artesanal apresentaram características físico-químicas e microbiológicas (incluindo contagens de microrganismos) adequadas e de acordo com a legislação vigente para os produtos disponíveis para o consumo, atualmente. No entanto, os mesmos leites fermentados apresentaram aceitações distintas nos dois tempos de análise avaliados,.

Comparando os dois tipos de leites fermentados, verifica-se uma maior aceitação do leite fermentado por *Lactobacillus fermentum* teve uma maior aceitação aos 60 dias de análise, possivelmente por apresentar menor acidez e maior pH. Isso ainda pode ter influenciado a viabilidade do microrganismo, pois o mesmo apresentou menor contagem quando comparado com o leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, apesar de não haver diferença significativa entre os valores na enumeração de bactérias ácido láctica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGADIR, W. S.; HAMAD, S. H.; MØLLER, P. L.; JAKOBSEN, M. Characterisation of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk *Rob. International Dairy Journal*, v. 11, p. 63-70, 2001.

ANZALDÚA-MORALES, A. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza: Acribia, 1994, 198p.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; p.1-66, 2004.

BALLONGUE, J. Bifidobacteria and probiotic action. In: Salminen, S.; Von Wright, A. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 357-428.

BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolates from traditional dairy products. *Food Control*, v. 21, n.5, p. 695-701, 2010.

BERNARDEAU, M.; VERNON, J.P.; HENRI-DUBERNET, S.; *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, v. 126, p. 278-285, 2008.

BOTELHO, L. *Isolamento e identificação de Lactobacillus e*

bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. 2005. 244f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

BOTTAZZI, V. An introduction to a rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, v. 70, p. 303-315, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria 146. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó*. Brasília, 1996. Publicado no Diário Oficial da União de 11/03/1996, Seção 1, Página 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 62. *Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*. Brasília. 2003. Publicado no Diário Oficial da União de 18/09/2003, Seção 1, Página 14

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. Brasília, 2005. 1018 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Instrução Normativa N° 68 Métodos Analíticos Oficiais para o Controle de Leite e Derivados*. Brasília, 2006. Publicado no Diário Oficial da União de 14/12/2006, Seção 1, Página 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Instrução Normativa N°46. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados*. Brasília, 2007. Publicado no Diário Oficial da União de 24/10/2007, Seção 1, Página 5.

BURITI, A.; SAAD, S.M. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinosamericanos de Nutrición*, v.57, n.4, p.373-380, 2007.

CHAVES, J. B. P. *Análise sensorial: histórico e desenvolvimento*. Viçosa: Editora UFV, 1998, 31p.

COLLINS, M.D.; PHILLIPS, B. A.; ZANONI P. Deoxyribonucleic Acid Homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 39, n. 2, p. 105- 108, 1989.

COUDEYRAS, S.; MARCHANDIN, H.; FAJON, C.; *et al.* Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 9, p. 2679-2689, 2008.

DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa *et al.*

1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 809-812, 2004.

DICKSON, E.M.; RIGGIO, M.P.; MACPHERSON, L. A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Medical Microbiology*, n. 54, p. 299-303, 2005.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILEJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt cold storage. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 4.ed. Madison: Marcel Dekker, 1996. 1069p.

FONS, M.; HÉGÉ, T.; LADIRÉ, M.; *et al.* Isolation and Characterization of a Plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid*, n. 37, p. 199 -203, 1997.

FULLER, R. A Review: Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. V.66. p. 365-378, 1989.

GARDINER, G.E.; HEINEMANNA, C.; BAROJAB, M.L.; *et al.* Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, n. 12, p. 191- 196, 2002.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus*

acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GUEDES NETO, L. G. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp e de bactérias ácido lácticas e de sua atividade antagonista in vitro*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus* In: Wood, B.J.B.; Rozapfel, W.H.; *The genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Chapman & Hall, p. 19 -54, 1995.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter Cultures and Their Use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*, 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, p. 151-206, 2001.

HEKMAT, S.; SOLTANI, H.; REID, G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as functional food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, p. 293-296, 2009.

IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk products: Enumeration of coliforms – colony count technique and most probable number technique at 30°C. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.73 A, p.1- 8 ,1985.

IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristics micro-organisms count technique at 37°C. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.117, p.1- 4,1988.

IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Determination of titratable acidity. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.150, p.1 - 2 ,1991.

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

JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002. 11 p.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 55, p. 103-125, 1998

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 44, n. 3, Set. 2008.

KOSIKOWSKI, F. V. *Cheese and fermented milk foods*. 2nd ed. Ann Harbor; Edwards, 1977. 711p.

KROEGER, M.; KURMANN, J.A; RASIC, J.L. Fermented milks – past, present and future. *Food Technology*, v. 43, p. 92-99, 1989.

KURMANN, J. A.; RASSIC, J. L. The health potential of products containing bifidobacteria. In: ROBINSON, R.K. *Therapeutic properties of fermented milks*. Essex (England): Elsevier, p.117-158, 1991.

LARA-VILLOSLADA, F.; SIERRA, S.; DÍAZ-ROPERO, M. P.; RODRÍGUEZ, J. M.; XAUS, J.; OLIVARES, M. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 a probiotic strain isolates from human milk. *Journal of Dairy Research*, v. 76, p. 216-221, 2009.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science Technology*, v. 6, p. 241-244, 1995.

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v.147, p. 747- 748, 1965.

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

MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; MARÍN, M. L.; FERNANDÉZ, L.; XAUS, J.; RODRIGUEZ, J. M. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast Milk. *Journal of Human Lactation*, v. 21, p. 8-17, 2005.

MONGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J.; *et al.* Food microorganisms- health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bulletin of the*

International Dairy Federation, n. 377, p. 4-9, 2003.

MORITA, H.; TOH, H.; FUKUDA, S.; *et al.* Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Research*, n. 15, p. 151-161, 2008.

MORITA, H.; YOSHIKAWA, H.; SAKATA, R.; *et al.* Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 24, p. 7812-7815, 1997.

O'SULLIVAN, M.G.; THORTON, G.; O'SULLIVAN, G.C.; *et al.* Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science & Tenchology*, v.3, p. 309 – 314, 1992.

OLIVEIRA, R.P.S; FLORENCE, A.C.R.; SILVA, R.C. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 128, n. 3, p. 467-472, 2009.

PARK, J. H.; LEE, Y. H.; MOON, E. P.; SEOK, S. H.; BAEK, M. W.; LEE, H. Y.; KIM, D. J.; KIM, C. H.; PARK, J. H. Safety Assessment of *Lactobacillus fermentum* PL9005, a potential probiotic lactic acid bacteria, in mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, n. 15, v. 3, p. 603-608, 2005.

PEREIRA, D.I.A.; McCARTNEY,A.L.; GIBSON, G.R.

An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4743-4752, 2003.

REID, G.; CHARBONNEAU, D.; ERB, J.; KOCHANOWSKI, B.; BEUERMAN, D.; POEHNER, R.; BRUCE, A. W. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS – Immunology and Medical Microbiology*, v. 35, p. 131-134, 2003.

ROBINSON, R. Therapeutics properties of fermented milks. Essex (England): Elsevier: 1991. 185p.

ROBINSON, R.K.; TAMINE, A.Y. Types of fermented milks. In: Tamine, A.Y. *Fermented milks*. Oxford: Blackwell Science, p. 3-10, 2006

RUSH, C.M.; MARCENIER, A.; POZZI, G. Expression of Vaccine Antigens in *Lactobacillus*. In: Pozzi, G.; Wells, J.M. *Gram-Positive Bacteria*. New York: Springer, p.107- 144, 1997.

SAARELA, M.; MONGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATILLA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 197-215, 2000.

SAITO, H.; WANTABE, T.; TADO, O. Protective effects of lactobacilli on experimental *Escherichia coli* infection.

Medicine and Biology, v. 101, p. 61-64, 1980.

SALMINEM, S. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, v. 10, p. 107-110, 1999.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 894-907, 2000.

SINGH, S.; GOSWAMI, P.; SINGH, R.; HELLER, K. J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT – Food Science and Technology*, v. 42, p. 448-457, 2009

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHAPE, M.E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. v. 2.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Cultured Milk and Yogurt. In: CHANDAN, Ramesh C.; KILARA, Arun.; SHAH, Nagendra P. *Dairy processing & quality assurance*. Ames: Wiley-Blackwell, p. 219-251, 2008.

VEDAMUTHU, E.R. Starter Cultures for Yogurt and Fermented Milks. In: Chandam, R.C. *Manufacturing yogurt*

and fermented milks. Oxford: Blackwell, p. 89-116, 2006.

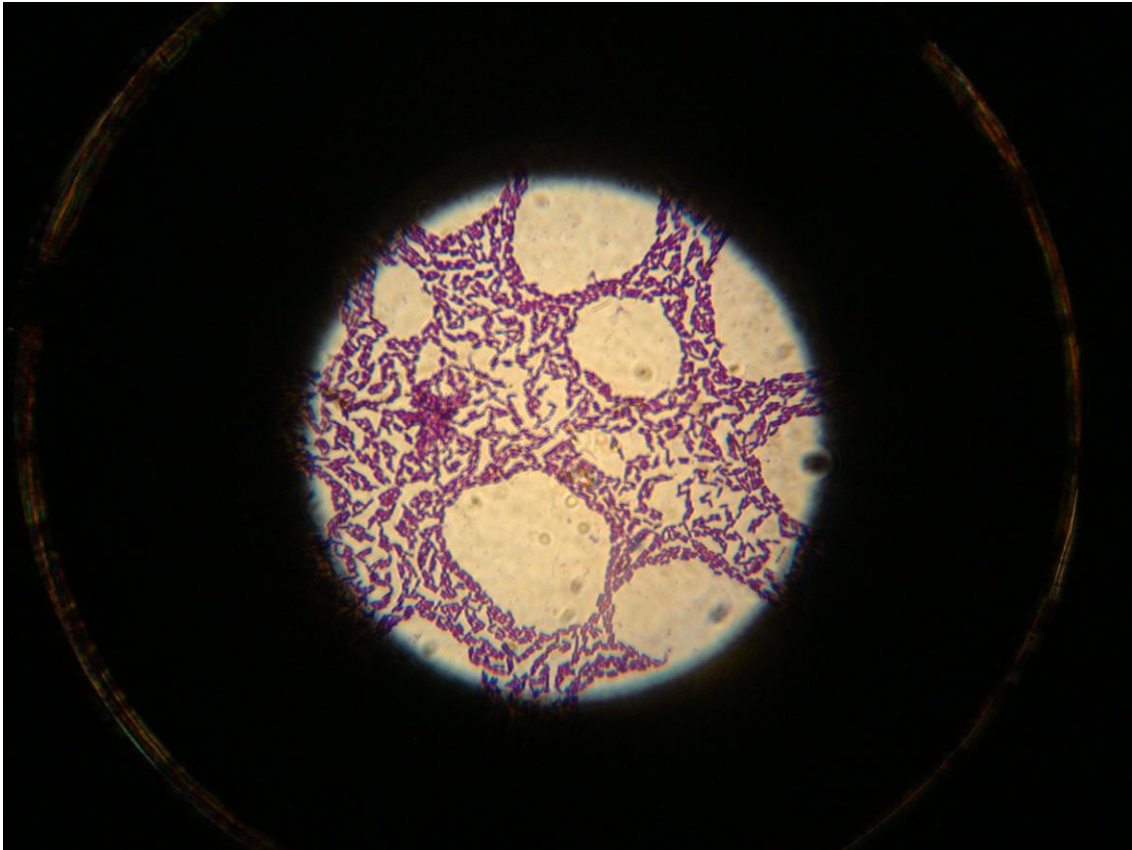
VIEGAS, R. P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T. C.; RESENDE, M. F. S.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo coalho de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n.2, p. 460-267, 2010.

WARD, L. J. H.; TIMMINS, M. J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p.90-92, 1999.

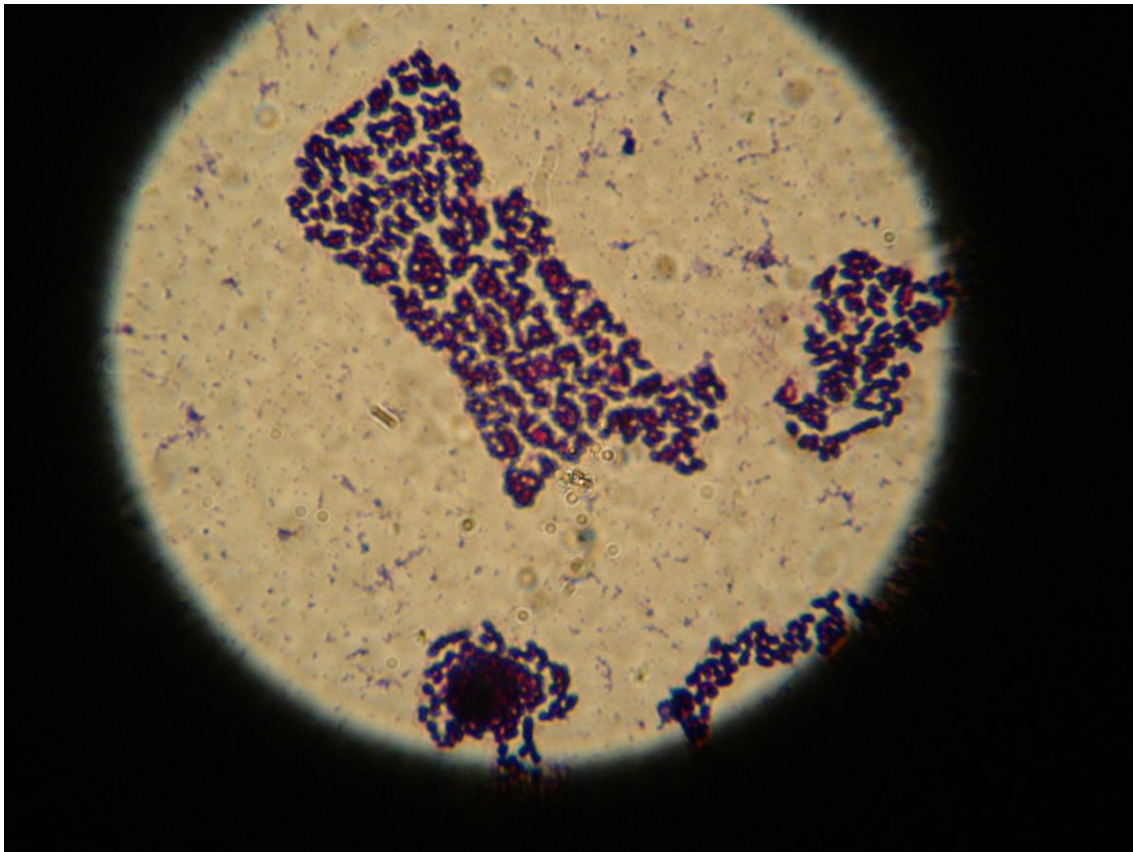
YEUNG, P. S. M.; SANDERS, M. E.; KITTS, C. L.; CANO, R.; TONG, P. S. Species-specific identification of commercial probiotic strains. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 1039-1051, 2002.

10. ANEXOS

Anexo 1: Teste de Gram *Lactobacillus rhamnosus* (100x de aumento – Microscópio óptico)



Anexo 2: Teste de Gram *Lactobacillus fermentum* (100x de aumento – Microscópio óptico)



Anexo 3: Crescimento em caldo MRS do *Lactobacillus fermentum* após 72 horas de incubação



Anexo 4: Crescimento em Caldo MRS do *Lactobacillus rhamnosus* após 72 horas de incubação



Anexo 5: Fotografia do coágulo formado por *Lactobacillus rhamnosus*



Anexo 6: Fotografia do coágulo formado por *Lactobacillus fermentum*



Anexo 7: Modelo da Ficha de Análise Sensorial utilizada nas análises sensoriais dos leites fermentados estocados por 15 e 60 dias sob refrigeração à 8-10°C.

FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Nome: _____ Data: _____

Por favor, prove com atenção as amostras.

Identifique o número de cada amostra e marque um x na linha abaixo, como se estivesse dando uma nota para o produto numa escala de 0 (zero) a 10 (dez). **Marque também uma das opções a seguir**, dando sua opinião sobre cada amostra.

Amostra: _____

0 _____ 10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Amostra: _____

0 _____ 10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Anexo 8: Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a Análise Sensorial

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de leites fermentados probióticos produzidos com bactérias produtoras de ácido lático isoladas de queijo coalho de Pernambuco”

Nome dos Pesquisadores: Marcelo Resende de Souza e Debora Pinheiro Guimarães Mendes

O senhor (senhora) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que tem a finalidade de avaliar as características sensoriais de leites fermentados produzidos a partir de bactérias produtoras de ácido lático isoladas de queijo coalho de Pernambuco.

Essa pesquisa contará com 30 pessoas, que tenham o hábito de consumir leites fermentados, sendo que o sexo e a idade não interferem na mesma.

O senhor (senhora) tem a liberdade de recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa.

O senhor (senhora) irá avaliar os leites fermentados produzidos nessa pesquisa através de formulários próprios, no laboratório de análise sensorial do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, localizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais, pois os produtos passarão por análises microbiológicas antes da análise sensorial, garantindo segurança ao senhor (senhora). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Todas as informações coletadas nesse estudo são confidenciais e somente os pesquisadores terão acesso aos dados individualmente e os mesmos serão divulgados de forma conjunta, sem citar nomes de participante.

Ao participar desta pesquisa o senhor (senhora) não terá benefício direto, mas esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a produção de leites fermentados, de forma que esse conhecimento os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

O senhor (senhora) não terá nenhum tipo de despesa para participar da mesma.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

Nome do Participante da Pesquisa

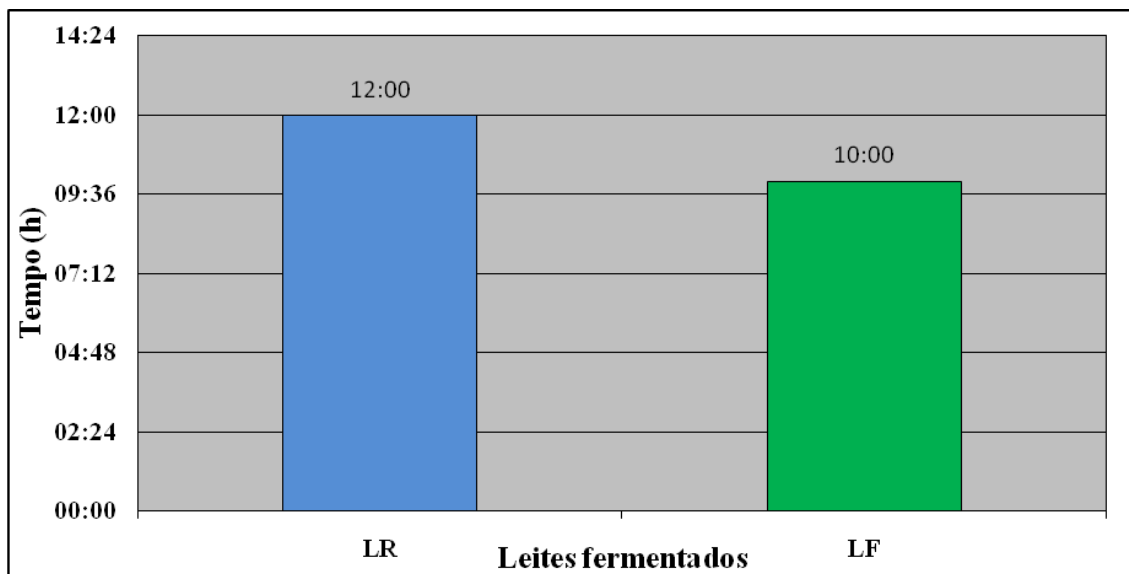
Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador 1

Assinatura do Pesquisador 2

Pesquisadores: Marcelo Resende de Souza, Debora Pinheiro Guimarães Mendes
Cômite de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar
– Sala 2005 – Campus Pampulha – Belo Horizonte – MG – Brasil – CEP: 31270-901 – Tel: (31) 3409-4592 - Email: coep@prpg.ufmg.br

Anexo 9: Média das duas repetições do tempo de fermentação dos leites desnatados adoçados esterilizados adicionados de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*



LR: leite fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*; LF: leite fermentado por *Lactobacillus fermentum*