

Elisa Helena Paz Andrade

**QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE
SORO LÁCTEO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
EM BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS**

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

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

Orientadora: Mônica de Oliveira Leite

Co-orientador: Marcelo Resende de Souza

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2010**

A553q Andrade, Elisa Helena Paz, 1984

Qualidade físico-química, microbiológica e detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em bebidas lácteas fermentadas/ Elisa Helena Paz Andrade.-2010
68p. : il

Orientadora: Mônica de Oliveira Leite

Co-orientador: Marcelo Resende de Souza

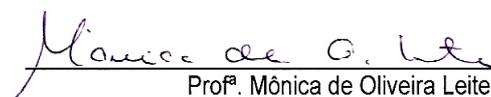
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

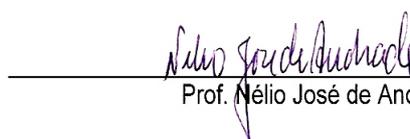
Inclui bibliografia

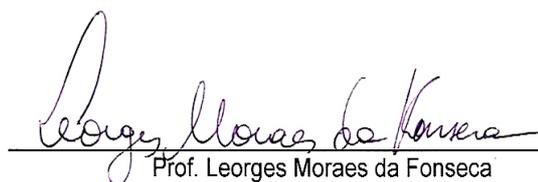
1. Leite fermentado – Análise - Teses.
2. Soro de leite – Análise - Teses.
3. Leite – Análise – Teses.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses.
5. Microbiologia – Teses. I. Leite, Mônica Oliveira. II. Souza, Marcelo Resende de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título

CDD 637.3

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof.^a Mônica de Oliveira Leite
Orientador


Prof. Nélio José de Andrade


Prof. Leorges Moraes da Fonseca

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Lúcia Helena e Geraldo, pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Igor, pela paciência e concessões.

Ao Luis Roberto pelo carinho, compreensão e estímulos.

À minha orientadora, Professora Mônica Leite, pelos ensinamentos, amizade, dedicação e confiança. Ao meu co-orientador, Professor Marcelo Resende, pela disponibilidade em me ajudar desde a graduação, atenção, paciência e ensinamentos.

À Professora Cláudia, pelas oportunidades propiciadas no DTIPOA, convivência e amizade.

À Professora Mônica Pinho, pela presteza em me ajudar, pela confiança e auxílio na obtenção de soro lácteo em pó utilizado nos experimentos.

Ao Professor Leorges, pela atenção, credibilidade e presteza em me ajudar.

Aos demais professores do DTIPOA, em especial Prof. Afonso pela agradável convivência e conselhos.

Aos colegas da Pós-graduação, em especial Tadeu, Alice, Bianca, Débora, Fátima, Fernanda, Cláudio, Hugo, Isabela, Leonardo e Roger pelos momentos de descontração, conversas, conselhos e favores. Às colegas veteranas de Mestrado, Andréia Kelly, Roane e Déborah Evangelista.

À Naiara, pela indispensável ajuda na parte experimental, companheirismo e amizade.

Ao Professor Nélio Andrade, pela participação na banca examinadora e contribuições para o trabalho.

Aos funcionários do DTIPOA, Maura, Taynara, Marco Antônio, Valéria, Evaldo, Miltinho e Fatinha pela grande ajuda, convivência harmoniosa e disponibilidade em me ajudar. Aos funcionários do Lab-UFMG, pela boa vontade em me auxiliar, mesmo em meio a tanto trabalho.

Aos Professores Marcus Xavier, Ângela e Miguel e ao Danilo pelos ensinamentos e valiosa ajuda nas análises estatísticas.

Ao laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do ICB-UFMG, em especial Tássia, Ariane e Flaviano.

Aos funcionários do setor de Físico-química de Produtos de Origem Animal do LANAGRO-MG, em especial Moisa, Lucimére, Eduardo Esteves, Eduardo Carvalho, Flávia, Ruth, Chris e Caio.

Ao Professor Álvaro Cantini e o doutorando João, pela indispensável ajuda com a Biologia Molecular.

Aos meus amigos, que de alguma forma sempre se fizeram presentes: Isabela, Fernando, Guilherme, Carlão, Raquelzita, Fred, Carol e Poliana.

Às secretárias Débora e Luzete e ao Sávio pela presteza, educação e paciência com que me receberam no Colegiado de pós-graduação da Escola de Veterinária.

Aos bibliotecários e funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária, em especial Ana Lúcia, Rosilene e Leila.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, em especial Cássia, Meire, Maricélia e Lili pela delicadeza, respeito e carinho com que sempre me trataram.

À Nádia, pela grande ajuda na formatação da dissertação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	15
	ABSTRACT.....	16
1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.	Leite	18
2.2.	Soro lácteo	19
2.3.	Bactérias ácido-lácticas e leites fermentados.....	20
2.4.	Bebida láctea.....	22
2.4.1.	Bebida láctea fermentada.....	23
2.4.1.1.	Inspeção de bebidas lácteas fermentadas.....	24
2.5.	κ -Caseína e Caseinomacropéptido	25
2.6.	Cromatografia.....	26
2.7.	Detecção de soro lácteo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Filtração em Gel (CLAE-FG)	27
2.8.	Proteólise e sua interferência na análise do índice de CMP	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1.	Avaliação físico-química e microbiológica de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	30
3.1.1.	Coleta das amostras para análises físico-químicas e microbiológicas.....	30
3.1.2.	Avaliação microbiológica das bebidas lácteas fermentadas	31
3.1.2.1.	Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	31
3.1.2.2.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em 25 mL.....	31
3.1.2.3.	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo.....	32
3.1.2.4.	Contagem de bolores e leveduras	32
3.1.2.5.	Contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis.....	32
3.1.2.5.1.	Purificação, testes morfológicos e bioquímicos e manutenção dos microrganismos isolados.....	32
3.1.3.	Identificação de bactérias ácido-lácticas por meio de técnicas de Biologia Molecular.....	33
3.1.3.1.	Obtenção de células sem parede e sem membrana	33
3.1.3.2.	Extração de DNA total.....	33
3.1.3.3.	Eletroforese em gel de agarose	33
3.1.3.4.	Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	33
3.1.3.5.	Restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rDNA com endonucleases específicas (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – ARDRA).....	34
3.1.4.	Avaliação físico-química das bebidas lácteas fermentadas	35
3.1.4.1.	Comparação dos métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb (Mojonnier) para análise do teor percentual de gordura das bebidas lácteas fermentadas.....	35

3.1.5.	Análise estatística	36
3.2.	Detecção de soro lácteo e CMP em bebidas lácteas fermentadas utilizando CLAE-FG	36
3.2.1.	Preparo dos leites e das bebidas lácteas fermentados	36
3.2.1.1.	Obtenção do leite	36
3.2.1.2.	Obtenção do soro lácteo.....	36
3.2.1.3.	Preparação da cultura láctica	36
3.2.1.4.	Misturas de leite e soro lácteo.....	37
3.2.1.5.	Inoculação da cultura de iogurte nas misturas de leite e soro lácteo e fermentação.....	37
3.2.2.	Preparo da curva de calibração do equipamento de cromatografia	37
3.2.3.	Procedimento de análise	39
3.2.4.	Cálculos	39
3.2.5.	Análise estatística	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1.	Avaliação físico-química e microbiológica de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	39
4.1.1.	Avaliação microbiológica das bebidas lácteas fermentadas	39
4.1.1.1.	Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	39
4.1.1.2.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	40
4.1.1.3.	Contagem de bolores e leveduras	41
4.1.1.4.	Contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis.....	41
4.1.2.	Avaliação físico-química das bebidas lácteas fermentadas	42
4.1.2.1.	Teor percentual de gordura.....	42
4.1.2.2.	Teor percentual de proteína	43
4.1.2.3.	Acidez titulável.....	44
4.1.2.4.	pH	45
4.1.2.5.	Umidade e Sólidos totais	46
4.1.2.6.	Comparação dos métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb (Mojonnier) para análise do teor percentual de gordura das bebidas lácteas fermentadas.....	47
4.1.3	Identificação de bactéria ácido-lácticas por meio de técnicas de Biologia Molecular e características morfológicas e bioquímicas	49
4.2.	Detecção de soro lácteo e CMP em leites e bebidas lácteas fermentados utilizando CLAE-FG	51
5.	RESUMO DOS RESULTADOS.....	54
6.	CONCLUSÕES.....	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8.	ANEXOS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição aproximada de soro doce e soro ácido	20
Tabela 2 -	Conformidade das amostras de bebidas lácteas fermentadas em relação aos padrões do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea para as pesquisas de coliformes totais e termotolerantes	40
Tabela 3 -	Número de repetições de bebidas lácteas fermentadas que apresentaram contagens de bactérias ácido-lácticas viáveis acima e abaixo de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL dentro de cada marca avaliada.....	42
Tabela 4 -	Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) do teor percentual de gordura das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas	43
Tabela 5 -	Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) do teor percentual de proteína das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas.....	44
Tabela 6 -	Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) de acidez titulável (g de ácido láctico/ 100g) das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas.....	45
Tabela 7 -	Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) de pH das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas	45
Tabela 8 -	Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) dos teores percentuais de umidade e sólidos totais das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas	47
Tabela 9 -	Teores percentuais de gordura de trinta amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidos utilizando-se o método butirométrico para leite fluido e o método de Mojonnier e teores percentuais médios para cada um desses métodos.....	48
Tabela 10 -	Resultados médios percentuais dos teores de soro lácteo, obtidos por CLAE-FG, de amostras de leites (0% de soro lácteo) e bebidas lácteas fermentados adicionadas de 10, 20 e 40% de soro lácteo em quatro tempos de armazenamento	52
Tabela 11 -	Resultados médios do índice de CMP em mg/L, obtidos por CLAE-FG, de amostras de leites (0% de soro lácteo) e bebidas lácteas fermentados adicionadas de 10, 20 e 40% de soro lácteo em quatro tempos de armazenamento	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de bebidas lácteas fermentadas.....	24
Quadro 2 -	Componentes da reação de PCR 16S-23S e seus respectivos volumes	34
Quadro 3 -	Programa utilizado na máquina termocicladora para PCR 16S-23S	34
Quadro 4 -	Componentes e volumes das misturas com e sem BSA	35
Quadro 5 -	Proporções de soro e leite utilizados de modo a se obter misturas com teores de soro de 10, 20 e 40% e leite sem adição de soro, para um volume final de 200 mL.....	37
Quadro 6 -	Proporções de soro e leite utilizados de modo a se obter misturas com teores de soro de 5, 10, 20, 40 e 50% e leite sem adição de soro (amostra branca) para preparo da curva de calibração	38
Quadro 7 -	Resultados das pesquisas de <i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e contagem de bolores e leveduras.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo esquemático da micela de caseína.....	25
Figura 2 -	Teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas pelo método de Mojonnier segundo o teor obtido pelo método butirométrico para leite fluido.....	49
Figura 3 -	Identificação molecular de bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de bebidas lácteas fermentadas.....	50
Figura 4 -	Índice de CMP de bebidas lácteas fermentadas de acordo com a porcentagem de soro	53

ANEXOS

Anexo 1-	Parâmetros relativos ao soro em pó parcialmente desmineralizado especificados em laudo fornecido pela Alibra Ingredientes Ltda junto ao produto.....	63
Anexo 2 -	Sobreposição dos padrões de soro utilizados para a construção da curva de calibração para o equipamento de CLAE-filtração em gel	64
Anexo 3 -	Sobreposição dos padrões de CMP utilizados para a construção da curva de calibração para o equipamento de CLAE-filtração em gel	65

Anexo 4 -	Foto do gel de agarose mostrando produtos da PCR-ARDRA 16S-23S rDNA de material genético de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais	66
Anexo 5 -	Foto do gel de agarose mostrando resultado da restrição enzimática de produto PCR- ARDRA 16S-23S rDNA de material genético de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais, identificado como <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	67
Anexo 6 -	Imagens de fotografias de microscopia direta do aspecto morfo-tintorial de colônias de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais, coradas pelo método de Gram (ampliação microscópica de 100 X).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
°D	Graus Dornic
%	Porcentagem
µL	Microlitros
Å	Angstrom
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	Análise de restrição do ácido desoxirribonucléico ribossomal
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPLS	Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose
BSA	Albumina sérica bovina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FG	Cromatografia líquida de alta eficiência-filtração em gel
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência-fase reversa
cm	Centímetro
CMP	Caseinomacropéptido
CO ₂	Dióxido de carbono
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
GMP	Glicomacropéptido
H ₂	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IN	Instrução Normativa
Kb	Kilobase
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
mM	Milimolar
m/m	Massa sobre massa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCE	Mercado Comum Europeu
mg/L	Miligramma por litro
Met	Metionina
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
N ₂	Nitrogênio
NANA	Ácido N-acetilneuramínico
nm	Nanômetro
NMP	Número mais provável
NNP	Nitrogênio não proteico
p/v	Peso sobre volume
PCR	Reação de polimerização em cadeia
Phe	Fenilalanina

ppm	Partes por milhão
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
rpm	Rotações por Minuto
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TCA	Ácido tricloroacético
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
V	Volt

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais; comparar os métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb para a aferição do teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas; quantificar o teor de soro e o índice de caseinomacropéptido (CMP) de bebidas lácteas fermentadas preparadas em laboratório, adicionadas de diferentes concentrações de soro (0, 10, 20 e 40%), fermentadas e armazenadas em refrigeração (8-10°C) por tempos distintos (0, 7, 14 e 21 dias), por cromatografia líquida de alta eficiência-filtração em gel (CLAE-FG); verificar a interferência da cultura utilizada no preparo das bebidas lácteas fermentadas e do tempo de armazenamento na detecção de soro e CMP. As 40 amostras de bebidas lácteas fermentadas avaliadas pertencentes a cinco marcas distintas, coletadas em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, foram analisadas na última semana do prazo final de validade. As mesmas apresentaram qualidade microbiológica satisfatória, bem como contagens totais de bactérias ácido-lácticas viáveis superiores ao mínimo estabelecido pela legislação. A avaliação de características morfológicas, bioquímicas e a utilização de técnicas de Biologia Molecular evidenciaram a presença de bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* em todas as marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas, sendo que, em três delas, foi possível identificar a espécie *Lactobacillus delbrueckii*. O teor médio de proteína de todas as marcas avaliadas foi superior ao mínimo preconizado pela legislação. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb, empregados para a aferição do teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas. Quando os teores de soro lácteo e os índices de CMP obtidos por CLAE-FG de bebidas lácteas fermentadas foram analisados ao longo do tempo de armazenamento, verificou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) para o leite (0% de soro) e as bebidas lácteas com 10 e 20% de soro nos tempos de 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. No entanto, para a bebida láctea fermentada adicionada de 40% de soro, foi observada diferença para o tempo de armazenamento de 21 dias ($p < 0,05$), em que o teor de soro e o índice de CMP obtidos foram maiores que os demais, que se mostraram equivalentes entre si ($p > 0,05$) para os tempos de 0, 7 e 14 dias.

Palavras-chave: bebidas lácteas fermentadas, físico-química, microbiologia, método butirométrico, método de Roesse-Gottlieb, soro lácteo, CMP, CLAE-FG, *Streptococcus*, *Lactobacillus*;

ABSTRACT

Physical-chemical and microbiological characteristics of fermented milk beverages sold at big markets from Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil were evaluated. Gerber and Roesse-Gottlieb methods to determine the fat content were compared. Cheese whey level and caseinomacropptide (CMP) index of fermented milk beverages added with four levels of cheese whey (0, 10, 20, and 40%) and stored at 8-10°C for 0, 7, 14 and 21 days were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) on a gel permeation column. Also, the interference of the starter culture and the storage time on the detection of cheese whey and CMP were investigated. Forty samples of five brands of fermented milk beverages collected at the market were analyzed in the last week of their shelf-lives. These samples showed satisfactory microbiological quality. The counts of lactic acid bacteria were higher than the minimum required by the Brazilian legislation. The morphological and biochemical characteristics of the isolates suggested the presence of *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp., which was confirmed by PCR-ARDRA 16S-23S, in products from all brands. It was also possible to identify *Lactobacillus delbrueckii* in three brands. The means of protein content of all products were higher than the minimum required by the Brazilian legislation. There was no difference ($P>0.05$) between means of fat content using both Gerber and Roesse-Gottlieb methods. Refrigerated storage up to 21 days did not affect ($P>0.05$) cheese whey and CMP amounts in milk (0% of cheese whey) and in fermented milk beverages added with 10 and 20% of cheese whey ($P>0.05$). However, cheese whey and CMP amounts were higher than expected ($P<0.05$) in fermented milk beverage added with 40% of cheese whey and stored for 21 days.

Keywords: fermented milk beverages, physical-chemical, microbiology, Gerber method, Roesse-Gottlieb method, cheese whey, CMP, HPLC, *Streptococcus*, *Lactobacillus*;

1- INTRODUÇÃO

Entende-se por soro lácteo o produto líquido obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou caseinatos. Ele representa 80 a 90% do volume de leite destinado à produção de queijo e apresenta cerca da metade do extrato seco total contido no mesmo. Portanto, em sua composição existe boa quantidade de excelentes nutrientes como lactose e proteínas de elevado valor biológico (Oliveira, 2006). No entanto, alguns de seus componentes, como as próprias proteínas, a gordura e o cálcio se encontram em menores quantidades em relação ao leite. Assim, a adição de soro lácteo ao leite compromete o teor de nutrientes deste último e constitui fraude de acordo com a legislação brasileira.

A adição de soro lácteo é permitida em alguns produtos como as bebidas lácteas. A bebida láctea é o produto resultante da mistura de leite e soro lácteo, adicionada ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A bebida láctea é classificada como fermentada quando a mistura de leite e soro é fermentada mediante ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionada de leites fermentados (Brasil, 2005). Assim, a incorporação de soro lácteo na tecnologia de fabricação das bebidas lácteas representa uma alternativa racional para seu aproveitamento (Almeida *et al.*, 2001).

As bebidas lácteas fermentadas possuem importante participação no mercado de leites fermentados. Um levantamento recente indica que elas representam 25% do total desse mercado no Brasil (Pflanzer *et al.*, 2007). Essas bebidas caracterizam-se por apresentar baixa viscosidade quando comparadas ao iogurte, sendo consideradas

leves e refrescantes. No entanto, pesquisas evidenciam que grande parte dos consumidores desconhece os produtos adicionados de soro lácteo, não sabendo a diferença entre bebida láctea fermentada e iogurte (Teixeira *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2007).

Os produtos fermentados, como as bebidas lácteas fermentadas, caracterizam-se por apresentar pH mais baixo e metabólitos produzidos por bactérias ácido-lácticas que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis. No entanto, alguns destes microrganismos são capazes de sobreviver nesse tipo de produto, caso haja alguma contaminação durante o processamento e armazenamento. Portanto, é importante que as bebidas lácteas fermentadas apresentem características microbiológicas adequadas aos padrões preconizados pela legislação (Brasil, 2005).

Em relação às características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas, merece destaque o teor de proteína. Por serem adicionadas de soro lácteo, que apresenta um menor teor protéico quando comparado ao leite, é importante que este parâmetro na bebida láctea esteja em conformidade com a legislação vigente (Brasil, 2005), tendo em vista que é um produto muito consumido por crianças, que apresentam elevados requisitos diários de proteína.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Bebida Láctea (Brasil, 2005) não determina a concentração máxima de soro lácteo a ser incorporada nas formulações comerciais. Dessa forma, a proporção entre leite e soro utilizada no processamento da bebida láctea se mostra aleatória e não muito bem definida (Almeida *et al.*, 2001). As indústrias processadoras deste produto podem estar adicionando grande quantidade de soro no preparo das mesmas, por se tratar de um ingrediente de

menor custo quando comparado ao leite; no entanto, essa prática pode comprometer o valor nutricional do produto, principalmente o teor de proteína. A Instrução Normativa (IN) nº 68 de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) oficializa a detecção de soro lácteo, por meio da quantificação do índice de caseinomacropéptido (CMP, péptido resultante da clivagem enzimática da κ -caseína, característico do soro) por cromatografia líquida de alta eficiência-filtração em gel (CLAE-FG). Este é o método analítico oficial físico-químico para pesquisa de soro lácteo em leite fluido e em leite em pó, mas não há relato da utilização desta técnica para quantificação de soro em bebidas lácteas.

Tendo em vista o que foi exposto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais, de forma a caracterizar este produto e verificar a conformidade com a legislação; comparar dois métodos para a aferição do teor de gordura de bebidas lácteas fermentadas; quantificar o teor de soro lácteo e o índice de CMP de bebidas lácteas fermentadas preparadas em laboratório, adicionadas de diferentes concentrações de soro e armazenadas por tempos distintos, por cromatografia líquida de alta eficiência-filtração em gel (CLAE-FG), utilizando o método para a pesquisa de soro em leite fluido e em leite em pó; verificar a interferência da cultura utilizada no preparo das bebidas lácteas fermentadas e do tempo de armazenamento na detecção de soro lácteo e CMP.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Leite

De acordo com o artigo 475 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de

Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (Brasil, 1997).

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, dada a sua composição peculiar, rico em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Ele constitui o alimento essencial dos recém-nascidos, para todas as espécies de mamíferos. O seu consumo está indicado para todas as idades da espécie humana e as restrições ao seu uso são limitadas a casos específicos (Oliveira *et al.*, 1999).

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas, carboidratos e outros componentes. Os glóbulos de gordura e as vitaminas lipossolúveis encontram-se em forma de emulsão. A lactose, as proteínas do soro, grande parte dos minerais, as vitaminas hidrossolúveis e as substâncias nitrogenadas não protéicas encontram-se dissolvidas na água do leite, formando uma solução. As proteínas, em forma de micelas de caseínas, apresentam-se em dispersão coloidal (Walstra e Jenness, 1987; Fox, 1997). O leite contém aproximadamente 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais. Do total de sólidos, 3,9% correspondem à gordura, 3,2% à proteína, 4,6% à lactose e 0,90% aos minerais e vitaminas (Harding, 1995). Assim, o leite é um produto complexo e completo, sendo considerado como uma das melhores fontes de nutrientes para os seres humanos.

Contudo, ao lado de sua indiscutível qualidade intrínseca, há o permanente risco desse produto veicular microrganismos patogênicos ou ser “alvo” de fraudes durante o processamento. Em ambas as circunstâncias, o produto passa a ser prejudicial para a saúde do consumidor

(Evangelista, 2008). O leite merece referência como responsável por surtos de gastroenterite devido à sua composição rica em nutrientes e, por ser muitas vezes consumido *in natura*, pode veicular, principalmente, *Staphylococcus* e suas toxinas pré-formadas (Germano *et al.*, 1993). Segundo o artigo 543 do RIISPOA, é considerado fraudado, adulterado ou falsificado, o leite que for adicionado de quaisquer elementos estranhos à sua composição. O artigo 878 deste mesmo regulamento preconiza ainda que o leite ou demais produtos de origem animal que forem adulterados, fraudados ou falsificados são considerados impróprios para o consumo no todo ou em parte (Brasil, 1997). As adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas são relativamente frequentes e diversificadas (Veloso *et al.*, 2002). Dentre as fraudes mais praticadas, podem ser citadas adição de soro lácteo, água e leite ao leite (Mafud *et al.*, 2007). Desta forma, é importante monitorar a qualidade do leite e de produtos lácteos.

2.2- Soro lácteo

O soro lácteo é um derivado da fabricação de queijos, caseinatos e seus derivados, que se separa do coágulo durante a fabricação convencional. Ele representa 80 a 90% do volume de leite que entra na produção do queijo, e possui, aproximadamente, 50 a 55% dos constituintes do mesmo (Kosikowski, 1979).

A composição e o tipo de soro lácteo produzido na indústria variam de acordo com os processos tecnológicos empregados, com o leite utilizado e com o tipo de queijo fabricado (Furtado e Wolfschoon-Pombo, 1979). Os principais tipos de soro lácteo são: o obtido por coagulação enzimática, definido como soro doce; e o obtido por coagulação ácida, o soro ácido. O soro de queijos como *cottage* e *petit-suisse* são exemplos de soro ácido, apresentando pH na faixa de 4,4 a 4,7 e a acidez titulável de, no

mínimo, 0,35% de ácido láctico. Por outro lado, o soro doce provém da fabricação de queijos como Minas padrão, *cheddar* e prato, apresenta pH entre 5,9 e 6,7 e acidez titulável de, no máximo, 0,18% de ácido láctico (Kosikowski, 1979). A tabela 1 mostra a composição aproximada dos soros ácido e doce.

O soro lácteo contém, aproximadamente, metade do extrato seco total do leite originalmente utilizado para a sua fabricação, apresentando, em média, 6,35 a 6,50% de sólidos totais. Deste total, cerca de 4,85 a 4,90% representam a lactose, 0,75 a 0,80% as proteínas (principalmente albuminas e globulinas), 0,04 a 0,50% a gordura, além de sais minerais (Kosikowski, 1979). O componente presente em maior porcentagem na porção sólida do soro lácteo é a lactose, sendo responsável pelo seu sabor adocicado (Ponsano *et al.*, 1992).

As proteínas constituintes do soro lácteo são: a beta-lactoglobulina, a alfa-lactalbumina, as imunoglobulinas e a soroalbumina bovina. Além destas, existem ainda várias outras proteínas, coletivamente denominadas “proteoses-peptonas”, muitas das quais são resultantes da proteólise da caseína (Mulvihill e Donovan, 1987, citados por Ponsano *et al.*, 1992), e enzimas, como lactoperoxidase, integrante do sistema lactoperoxidase; lisozima, que provoca a lise de células bacterianas, e a lactoferrina, que remove íons ferro do soro e inibe bactérias como *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (Walstra *et al.*, 2001). As proteínas do soro, especialmente a alfa-lactalbumina, possuem elevado valor nutritivo. A composição de aminoácidos das mesmas é muito semelhante à composição considerada ótima. Produtos derivados de proteínas do soro são largamente utilizados na indústria alimentícia (DAIRY..., 2003).

Segundo Dalgleish (1986), o soro lácteo obtido por via enzimática (coalho) contém CMP, única fração da caseína contendo

glicídios em sua estrutura, resultante da ação específica da renina sobre a κ -caseína, sendo, portanto, um componente exclusivo do soro lácteo, não sendo encontrado naturalmente no leite.

O soro lácteo é uma importante fonte de poluição em rios por meio de efluentes

industriais, por apresentar elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), entre 30.000 e 50.000 ppm (Marwaha e Kennedy, 1988).

A demanda bioquímica se refere à quantidade de oxigênio necessária para que ocorra a degradação bioquímica do material orgânico em questão.

Tabela 1- Composição aproximada dos soros doce e ácido

COMPOSIÇÃO APROXIMADA DE SORO LÁCTEO (%)		
Constituinte	Soro doce	Soro ácido
Sólidos totais	6,4	6,5
Água	93,6	93,5
Gordura	0,05	0,04
Proteína verdadeira	0,55	0,55
NNP (nitrogênio não protéico)	0,18	0,18
Lactose	4,8	4,9
Minerais	0,5	0,8
Cálcio	0,043	0,12
Fósforo	0,040	0,065
Sódio	0,050	0,050
Potássio	0,16	0,16
Cloreto	0,11	0,11
Ácido láctico	0,05	0,4

Fonte: adaptado de DAIRY...(2003)

O soro lácteo apresenta altos valores de DBO por possuir elevada quantidade de matéria orgânica em sua composição, representada pelas proteínas e pela lactose (Ponsano *et al.*, 1992).

A adição de soro lácteo ao leite pasteurizado, esterilizado, ultra alta temperatura (UAT) ou em pó constitui fraude de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 1997). A resolução 1725/79 do Mercado Comum Europeu (MCE) estabelece esta mesma proibição para leite em pó. A adição de soro é permitida em alguns produtos como as bebidas lácteas (Brasil, 2005) e alguns queijos, como a ricota que ainda não possui padrão de identidade e qualidade.

O aproveitamento do soro no Brasil está em ascensão, mas ainda é limitado, sendo mais

frequentemente empregado na produção de soro em pó, bebida láctea e ricota (Teixeira, 2005). A utilização do soro no Brasil tem-se ampliado com o desenvolvimento de novos produtos. Destaca-se seu alto valor nutritivo, além de versatilidade para a utilização em diversos produtos, tais como bebidas lácteas, alimentação infantil, panificação, embutidos, entre outros (Vilela *et al.*, 2001). Dentre as alternativas para o adequado aproveitamento do soro de leite pode ser citada o uso do mesmo *in natura* para a fabricação de bebida láctea, que constitui uma forma de valorização desse produto (Valente *et al.*, 2007).

2.3- Bactérias ácido-lácticas e leites fermentados

Bactérias ácido-lácticas são microrganismos que possuem muitas propriedades

fisiológicas em comum e também apresentam semelhanças em seu comportamento ecológico. As bactérias ácido-láticas típicas são: Gram-positivo, não produtoras de esporos, catalase-negativo, desprovidas de citocromo, de habitat não aeróbico, aero-tolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativas, sendo o ácido lático o produto final formado em maior quantidade durante a fermentação de carboidratos. Bactérias ácido-láticas são, geralmente, associadas a habitats ricos em nutrientes, tais como vários produtos alimentícios (leite, carne e vegetais), mas algumas são membros da microbiota normal da boca, intestino e vagina de mamíferos (Salminen e Von Writh, 1993). A ocorrência das bactérias ácido-láticas é bastante disseminada. Essas bactérias são essenciais em muitos processos na indústria de produtos lácteos, na acidificação de plantas e outros materiais e, até mesmo, de resíduos, como no caso da cerveja, e ainda na confecção do vinho (Carr *et al.*, 1973).

O grupo das bactérias ácido-láticas é composto de 13 gêneros de microrganismos Gram-positivo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay *et al.*, 2005). As bactérias ácido-láticas podem ser divididas em dois grupos: homofermentativo, que converte glicose quase que totalmente em ácido lático e heterofermentativo, que fermenta glicose para ácido lático, etanol/ácido acético e CO₂ (Sharpe, 1979).

A origem dos leites fermentados data de longo tempo, não sendo possível uma precisa definição de seu aparecimento. No início do século XX, a partir de estudos de Metchnikoff, no *Institute Pasteur* (Paris, França), as pesquisas começaram a associar a produção de leites fermentados com o

metabolismo de microrganismos lácteos. A partir destas descobertas, várias culturas láticas foram isoladas e caracterizadas, bem como o processo de fermentação passou a ser controlado e padronizado pelas indústrias (Robinson, 1991). A fabricação de alimentos e bebidas fermentadas na indústria segue processos controlados de fermentação, utilizando microrganismos iniciadores selecionados, garantindo uniformidade e qualidade ao produto final (Guedes Neto, 2004).

A fermentação, quando conduzida em uma indústria de produtos lácteos, é caracterizada como um processo químico e biologicamente controlado de preservação de alimentos. Como resultado da mesma, ocorre um metabolismo incompleto dos componentes do leite, uma pré-digestão, que é considerada benéfica, e a produção de compostos intermediários, com destaque para o ácido lático e outros ácidos orgânicos, como o ácido acético, assim como muitos outros compostos orgânicos que podem controlar o comportamento de vários microrganismos. O pH baixo em todos os produtos lácteos fermentados comparados com o do leite não só retarda o crescimento de microrganismos indesejáveis nos mesmos, como também confere um sabor agradável e mantém suas propriedades (Robinson, 1991). No entanto, a capacidade das bactérias ácido-láticas de inibir outros microrganismos não é somente resultado da diminuição do pH desencadeada pelas mesmas, mas depende também da natureza dos ácidos orgânicos que elas produzem. Outras substâncias produzidas pelas bactérias ácido-láticas, como metabólitos de oxigênio, por exemplo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bacteriocinas, diacetil, acetaldeído e isômeros de D-aminoácidos também potencializam a atividade inibitória das mesmas (Piard e Desmazeaud, 1991).

De acordo com o RTIQ de Leites Fermentados (Brasil, 2007), entende-se por

Leites Fermentados 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 outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. Incluem-se entre os tipos de leites fermentados o iogurte, o leite acidófilo, o Kefir, o Kumys e a coalhada. Um dos leites fermentados mais conhecidos é o iogurte que, além de ser vendido como produto final, pode ser utilizado como ingrediente para elaboração de bebidas lácteas fermentadas (Oliveira, 2006).

Desta forma, entende-se por iogurte o produto, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subspécie *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subspécie *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final. O requisito mínimo de contagem de bactérias ácido-lácticas totais exigido pela legislação brasileira para o iogurte é de 10^7 UFC/g (Brasil, 2007). As bactérias lácticas, em convívio simbiótico nesse produto, atuam sinergicamente. No início da fermentação, o pH do leite favorece o desenvolvimento de *Streptococcus salivarius* subspécie *thermophilus*. Com o aumento da acidificação, ou seja, do teor de ácido láctico, crescem os *Lactobacillus delbrueckii* subspécie *bulgaricus*. Estes são proteolíticos, obtêm aminoácidos a partir da caseína (glicina, histidina e valina) e ativam o crescimento dos estreptococos que, por sua vez, estimulam o crescimento dos lactobacilos, com a produção de ácido

fórmico e gás carbônico (Martins e Luchese, 1988).

2.4- Bebida láctea

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

A bebida láctea pode ser classificada de acordo com o tratamento térmico a que é submetida em pasteurizada, esterilizada, UAT ou tratada termicamente após fermentação. De acordo com a adição ou não de outros produto(s) alimentício(s) ou substância(s) alimentícia(s), a bebida láctea é classificada em bebida láctea com adição ou bebida láctea sem adição. Neste último produto, a base láctea deve representar 100% m/m do total de ingredientes. Em relação à fermentação láctica, a bebida láctea classifica-se em fermentada ou não fermentada. A bebida láctea fermentada pode ser com adição ou sem adição (Brasil, 2005).

O RTIQ de Bebida Láctea não traz uma definição de “base láctea”, mas, por meio do conceito de bebida láctea sem adição, em que a base láctea deve representar 100% m/m, pode-se inferir que a mesma corresponde a leite e soro. No entanto, considerando 51 ou 100% de base láctea, o Regulamento não fixa uma concentração máxima de soro lácteo a ser utilizado na mistura com o leite. Portanto, não há uma especificação da porcentagem máxima de soro lácteo a ser incorporada nesse produto.

O limite para essa adição deveria ser regulado pelo teor de proteínas da mistura, que deve estar de acordo com o mínimo preconizado pelo Regulamento em questão, pois, como o soro lácteo apresenta menor teor protéico que o leite, deveria ser incorporado até o ponto de não diminuir esse teor em demasia.

Segundo Pflanzler *et al.* (2007), quando as bebidas lácteas foram lançadas, tinham como objetivo atrair consumidores das classes C e D. Com o Plano Real, o atrativo “preço” foi uma das principais razões do crescimento do mercado desse produto, o que possibilitou, inclusive, o consumo desses produtos pela classe E. A elaboração de bebidas com soro lácteo líquido envolve equipamentos e acessórios comuns, encontrados na maioria dos laticínios. Portanto, a fabricação de bebidas lácteas no Brasil utilizando soro lácteo líquido tornou-se uma opção atrativa (Sivieri e Oliveira, 2002).

De acordo com o RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) são ingredientes opcionais lácteos permitidos para a produção de bebida láctea: creme, sólidos de origem láctea, manteiga, gordura anidra do leite ou *butter oil*, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, leite e outros produtos de origem láctea. Os ingredientes opcionais não lácteos (isoladamente ou em combinação) podem ser: açúcares e/ou glicídios, maltodextrina, edulcorantes nutritivos e não nutritivos, frutas em pedaços/polpa/suco e outros preparados à base de frutas, mel, cereais, vegetais, gorduras vegetais, chocolate, frutas secas, café, especiarias e outros alimentos aromatizantes naturais e inócuos e/ou sabores, amidos ou amidos modificados, gelatina ou outros ingredientes (produtos ou substâncias alimentícias).

2.4.1- Bebida láctea fermentada

A bebida láctea fermentada é o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in*

natura, esterilizado, pasteurizado, UAT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro lácteo (líquido, concentrado e em pó) e fermentada mediante ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionada de leites fermentados. Desta forma, a bebida láctea fermentada deve conter como ingredientes obrigatórios: leite, soro lácteo e cultivos de bactérias lácticas específicas e/ou leites fermentados. Essa mistura não poderá ser submetida à tratamento térmico após a fermentação. A classificação de bebida láctea fermentada com adição refere-se ao produto adicionado de leite fermentado, produto(s) ou substância(s) alimentícia(s) enquanto a bebida láctea fermentada sem adição refere-se ao produto sem adição desses mesmos ingredientes. A contagem total de bactérias lácticas viáveis nas bebidas lácteas fermentadas deve ser, no mínimo, de um milhão de Unidades Formadoras de Colônias por grama (10^6 UFC/g), no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (Brasil, 2005).

Um levantamento recente indica que bebidas lácteas fermentadas já representam 25% do mercado total de leites fermentados no Brasil (Pflanzler *et al.*, 2007). A tecnologia de fabricação dessas bebidas lácteas baseia-se na mistura de iogurte e soro em proporções adequadas, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes, polpa de frutas e outros, de acordo com a formulação do produtor (Sivieri e Oliveira, 2002). Entretanto, Andrade *et al.* (2007) e Teixeira *et al.* (2005), em estudos realizados no mercado varejista de Belo Horizonte e do Rio de Janeiro, respectivamente, constataram que o consumidor desconhece os produtos que contêm soro de leite, não sabendo a diferença entre bebida láctea fermentada e iogurte.

2.4.1.1- Inspeção de bebidas lácteas fermentadas

O único parâmetro físico-químico cujo padrão é estabelecido no RTIQ de Bebida Láctea (Braisl, 2005) para bebidas lácteas fermentadas é o teor de proteínas. O requisito mínimo para teor de proteínas de bebidas lácteas fermentadas é de 1,7% para bebidas lácteas fermentadas sem adições, 1,4% para bebidas lácteas fermentadas adicionadas de leite(s) fermentado(s) e 1,0% para bebidas lácteas fermentadas com adições ou bebida láctea fermentada com produto(s) ou substância(s) alimentícia(s).

Em relação à segurança alimentar, há grande preocupação por parte dos órgãos de vigilância sanitária, tanto da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), com a inocuidade dos alimentos comercializados em todo o País e em Minas Gerais. A segurança alimentar tem sido alvo de muitas pesquisas científicas que acabam por mostrar que grande parte dos alimentos comercializados se encontra fora dos padrões higiênico-sanitários estabelecidos por lei, para garantir a saúde pública. A presença de vários patógenos é relatada em produtos lácteos, principalmente em queijos (Tebaldi *et al.*, 2007).

Alguns microrganismos coliformes podem sobreviver em iogurte e bebidas lácteas. Dentre eles, encontram-se a *Escherichia coli* O157:H7 e outras amostras de *E. coli* que também apresentam a capacidade de sobreviver em alimentos ácidos como o iogurte, por considerável período (Lee e Chen, 2005). *Salmonella* spp. também possui boa sobrevivência em iogurtes, mesmo com a acidificação desencadeada pela cultura iniciadora (Nassib *et al.*, 2006). Além de bactérias, leveduras foram isoladas de várias amostras de iogurte (Suriyarachchi e Fleet, 1981). Nesse trabalho, as espécies encontradas com maior frequência foram *Torulopsis candida*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulopsis versatilis*.

Os parâmetros microbiológicos preconizados pela legislação para bebidas lácteas fermentadas são: a contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis, que deve ser de, no mínimo, 10^6 UFC/g no produto final durante todo o prazo de validade e a pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C, como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1- Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de bebidas lácteas fermentadas

Microrganismos	Critério de Aceitação	Método de Análise
Coliformes/mL (ou/g) - 30/35°C	n=5 c=2 m=10 M=100	Instrução Normativa nº 62, 2003
Coliformes/mL (ou/g) - 45°C	n= 5 c=2 m<3 M=10	Instrução Normativa nº 62, 2003

Fonte: Adaptado de Brasil (2005)

2.5- κ -Caseína e Caseinomacropéptido

As caseínas correspondem a 76-86% do total de proteínas do leite e são representadas por quatro produtos gênicos: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína. As caseínas estão agregadas na forma de micelas, que são complexos esféricos e largos que contêm 92% de proteína e 8% de sais orgânicos, principalmente fosfato de cálcio (Fox, 1997). A figura 1 mostra o modelo da micela de caseína.

A κ -caseína é a fração mais solúvel das caseínas na presença de uma ampla faixa de concentração do íon cálcio. Ela representa 15% do total das caseínas e atua como agente estabilizador da micela. Esta proteína é constituída de 169 aminoácidos, com, pelo menos, um grupo fosfato e uma porção glicídica variável (Walstra e Jenness, 1984).

Nas micelas de caseína, a maioria da κ -caseína está no exterior e as cadeias que sobressaem de sua porção C-terminal conferem à micela uma superfície “pilosa” (Walstra e Jenness, 1987).

A enzima quimosina (renina) hidrolisa rapidamente a κ -caseína, atuando na ligação Phe(105) - Met(106), gerando um fragmento N-terminal denominado para- κ -caseína, que contém os resíduos de cisteína e outro fragmento C-terminal de 64 aminoácidos, chamado macropéptido, que contém todos os grupos carboidrato e fosfato e também as variações genéticas (Walstra e Jenness, 1987). Pelo fato de carrear todos os açúcares da κ -caseína, esse fragmento é também conhecido como glicomacropéptido (GMP), sendo que um desses açúcares é o ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico.

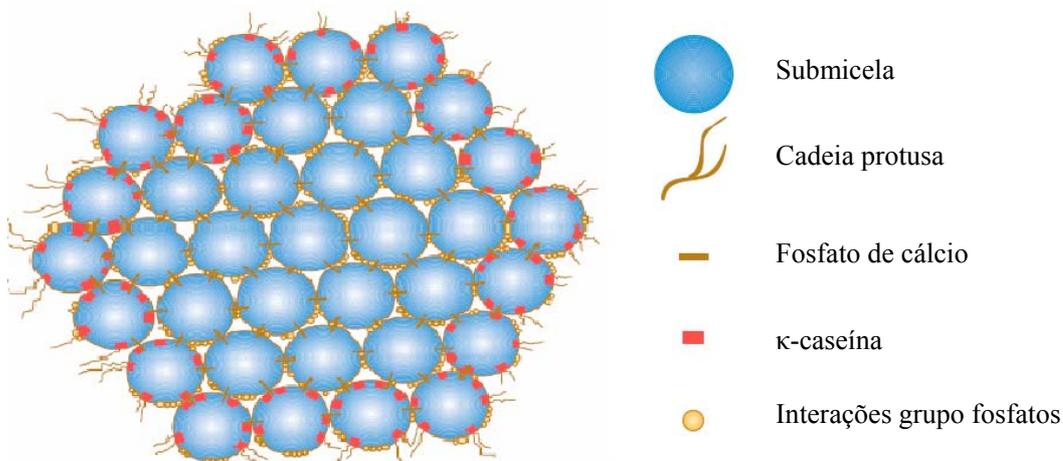


Figura 1- Modelo esquemático da micela de caseína
Fonte: DAIRY..., 2003

A κ -caseína é heterogênea, apresentando duas variantes genéticas A e B. O teor de carboidratos nesta molécula pode variar de 0 a 15% e, como há a possibilidade de se obter fragmentos com ausência glicídica, o peptídeo terminal pode ser chamado de macropeptídeo ou CMP, o qual permanece solúvel no soro e é separado do coágulo durante a fabricação de queijos (Guinee e Wilkinson, 1992). O CMP também é solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 8% (Vreeman *et al.*, 1986).

O CMP possui caráter hidrofílico, devido à polaridade conferida pelos seus constituintes; estabilidade térmica elevada, devido ao elevado conteúdo de ácido siálico em sua estrutura; peso molecular de aproximadamente 8.000 Daltons, podendo ser separado de outros peptídeos e proteínas por meio de colunas de cromatografia líquida de alta eficiência-fitração em gel (CLAE – FG). Contrariamente, o resíduo para- κ -caseinato apresenta caráter hidrofóbico (Alvim, 1992).

2.6- Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais desses componentes (Collins *et al.*, 1997). Portanto, em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. A fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em

uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus. Os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas diferenças na mobilidade, os componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (Skoog *et al.*, 2002).

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett que, em 1906, os utilizou em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, nos quais usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo. O nome deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados. São vários os critérios usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo os mais comuns relacionados à técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas (Collins *et al.*, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação (Skoog *et al.*, 2002). A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes

em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins *et al.*, 1997).

A cromatografia de filtração em gel ou de exclusão molecular se distingue das demais por apresentar um recheio ou gel constituído de macromoléculas que tem ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis. O espaço entre as partículas é ocupado pelo líquido que flui pelo material, levando, ou não, as substâncias a serem separadas. O caráter da fase estacionária controla o movimento das substâncias, variando suas velocidades e, assim, promovendo a separação (Collins *et al.*, 1997).

2.7- Detecção de soro lácteo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Filtração em Gel (CLAE-FG)

De acordo com Dracz (1996), a determinação do caseinomacropéptido, por se tratar de um componente específico do soro lácteo, que deve estar ausente no leite, é um excelente indicador da presença de fraude. Segundo Carvalho *et al.* (2007), o CMP é geralmente quantificado por métodos cromatográficos, particularmente a cromatografia de filtração em gel (CLAE-FG).

Van Hooydonk e Olieman (1982) desenvolveram, originalmente, um método de cromatografia líquida de alta eficiência, por filtração em gel, visando acompanhar a ação da quimosina no leite, uma vez que a coagulação do mesmo, promovida por esta enzima é um processo complexo, envolvendo a proteólise da κ -caseína e a agregação subsequente das micelas de caseínas instáveis. Nesse trabalho, a CLAE foi utilizada para determinar o conteúdo de CMP do leite.

Olieman e Van den Bedem (1983) utilizaram a CLAE com uma coluna de

permeação em gel para a determinação de sólidos totais de soro lácteo em leite em pó desnatado. Para tal, esses pesquisadores realizaram algumas modificações na técnica descrita por Van Hooydonk e Olieman (1982) para que esta estivesse apta a determinar com acurácia a quantidade de sólidos totais de soro lácteo em leite em pó desnatado pela determinação de CMP. Com base nos resultados das análises de 43 amostras de leite em pó desnatado oriundas da Holanda, sem adulteração com soro lácteo, foi encontrado um limite de detecção de 0,5%. As amostras de leite em pó de outros Países do MCE (n = 47) apresentaram um limite de detecção de 0,8%. A adição de soro ácido ao leite em pó desnatado não pôde ser detectada por esta metodologia. Ainda, segundo estes autores, em leite armazenado sob refrigeração, bactérias produtoras de proteinases podem se desenvolver e são capazes de hidrolisar a κ -caseína em para- κ -caseína e CMP. A análise de leite em pó desnatado produzido com um leite desse tipo pelo método da CLAE descrito pode gerar um resultado falso positivo para presença de soro lácteo.

Lumley *et al.* (1987) testaram uma coluna de sílica preparada no laboratório, com diâmetro de poro de 13 nm, usando, como amostra, uma solução contendo CMP. Eles concluíram que a utilização dessa coluna, pela técnica da exclusão molecular em colunas de alto desempenho, permitia, com extrema resolução, a separação de CMP dos demais componentes da amostra. A CLAE foi utilizada no estudo de peptídeos sintéticos resultantes da degradação da caseína (Karlsson *et al.*, 1988).

Morr e Seo (1988) testaram o método de preparação de amostras sugerido por Olieman e Van den Bedem (1983), visando a eliminação de proteínas de alto peso molecular e da gordura, utilizando duas colunas TSK 2000 SW. Posteriormente,

Olieman e Hooydonk¹ (1985), citados por Alvim (1992), recomendaram a coluna de filtração em gel GF-250 (Du Poit), por apresentar melhor resolução e menor tempo de análise do que a TSK 2000 SW.

Vilder *et al.* (1988) utilizaram a CLAE na detecção de sólidos de soro em produtos lácticos ácidos (leite ou creme fermentado) por meio da quantificação de CMP. Nesse estudo, foi utilizada uma coluna Zorbax (Bio Series G. F. 250 Dupont 4 μ L, tamanho do poro 150 Å) de 25 cm de comprimento e diâmetro interno de 9,4 mm. Foi verificado que a acidificação pode alterar drasticamente todo o padrão da CLAE, mas ainda assim é possível detectar a presença de soro lácteo em produtos com essa característica.

Brandão *et al.* (1988) utilizaram a metodologia desenvolvida por Olieman e Van den Bedem (1983), com algumas modificações, na análise de leite tipo C de diversas regiões do Brasil. Alvim (1992) utilizou a CLAE-FG para avaliar o efeito da qualidade do leite sobre a detecção de soro lácteo em amostras de leite fluido e de leite em pó. Para tal, utilizou uma solução de TCA 24% para o preparo das amostras. Foi empregada a coluna de filtração em gel Zorbax GF 250 e a fase móvel foi uma solução tampão pH = 6, composta pelos mesmos sais utilizados por Van Hooydonk e Olieman (1982). Esse método possibilitou a detecção de mais de 1% de soro em pó em leite em pó.

Lasmar (2007) analisou, por CLAE-FG, amostras de leite adicionadas do conservante bronopol em forma de comprimido, bem como amostras de leite sem este conservante. O mesmo é utilizado para conservação de amostras de leite cru remetidas aos laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) para a análise de composição centesimal e contagem de células somáticas. Foram

testados, nos dois grupos, cinco níveis de adição de soro lácteo (0, 2, 5, 10 e 20%). No grupo do bronopol, foram testadas as temperaturas de armazenamento de 7 e 30°C e, no grupo sem conservante, as amostras foram congeladas. Todas as amostras foram armazenadas durante oito dias e analisadas no segundo, quarto e oitavo dias. Não foi observada diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos realizados, indicando que, amostras adicionadas de bronopol e armazenadas a 7 e 30°C por períodos de até oito dias, podem ser analisadas por CLAE sem que ocorra alteração dos resultados esperados quando comparados com a recomendação do MAPA, para o envio de amostras (congeladas e sem conservante).

A IN n° 68 do MAPA, de 12 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006), oficializou a detecção de CMP por cromatografia líquida de alta eficiência, método da filtração em gel como Método Analítico Oficial Físico-Químico para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Essa IN preconiza a mudança no preparo da curva de calibração do equipamento de cromatografia, que passa a ser realizada com padrões de CMP e não mais com soro lácteo líquido, o que tornou o método mais seguro. O resultado passou a ser expresso como concentração de CMP, em mg/L, e não mais em porcentagem de soro lácteo. De acordo com a IN n° 69 do MAPA (Brasil, 2006), somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 e 75mg/L este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos. Quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg/L, este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).

Andrade *et al.* (2009), ao realizarem a análise do índice de CMP em 109 amostras

¹ Comunicação pessoal

de leite cru de diversas regiões de Minas Gerais por CLAE-FG, verificaram que 77,1% (84) das mesmas apresentaram índice de CMP de até 30 mg/L, 20,2% (22) apresentaram este índice entre 30 e 75mg/L e apenas 2,7% (3) se encontravam acima de 75 mg/L. Isso, provavelmente, se deve ao fato das amostras serem de leite cru em que há a ocorrência de proteólise devida a ação de proteases de bactérias psicrotróficas.

Segundo Silva *et al.* (2009), 82 amostras de leite em pó de 52 marcas comerciais diferentes, provenientes das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, foram analisadas por CLAE-FG para a determinação do índice de CMP. Foi observado que 54,9% (47) das mesmas apresentaram índice de CMP de até 30 mg/L, 24,4% (20) apresentaram este índice entre 30 e 75mg/L e 20,7% (17) se encontravam acima de 75 mg/L. A análise destes resultados revela a necessidade de se fazer um controle mais rigoroso da qualidade do leite em pó comercializado, visto que a incidência de amostras não conformes com os padrões legais vigentes foi bastante alta.

2.8- Proteólise e sua interferência na análise do índice de CMP

É importante considerar a proteólise causada por microrganismos psicrotróficos, que podem estar presentes no leite, como um fator interferente na detecção de soro lácteo por CLAE-FG. A proteólise no leite pode ocorrer devida a ação de enzimas nativas, como a plasmina; por enzimas adicionadas, principalmente durante a fabricação de queijos, como, por exemplo, a renina ou por enzimas produzidas pela microbiota presente, que pode contaminar o leite por meio de ordenha realizada em condições inadequadas de higiene ou pelos utensílios mal lavados utilizados durante a sua coleta ou por falta de hábitos higiênicos adequados por parte do ordenhador (Fukuda, 2003).

Muitos microrganismos psicrotróficos produzem proteinases e lipases estáveis aos tratamentos térmicos ainda que as bactérias produtoras dessas enzimas sejam destruídas. Mesmo em baixa concentração essas enzimas são capazes de produzir lipólise e proteólise em leite e seus derivados (Law, 1979).

Alguns resultados obtidos por Recio *et al.* (2000), sobre peptídeos oriundos da ação de proteinases de bactérias psicrotróficas sobre a κ -caseína, demonstraram que estas enzimas hidrolisam essa proteína na ligação entre os aminoácidos Phe(105) - Met(106). Desse modo, a presença de CMP em leite UAT não pode ser considerada exclusivamente indicador de adulteração do leite com soro lácteo. Law (1979) demonstrou que *Pseudomonas* e *Acinetobacter* em concentrações de 10^7 UFC/mL ou acima produzem proteinases suficientes para degradar a κ -caseína. Algumas proteinases, principalmente as produzidas por *Pseudomonas fluorescens*, são termorresistentes, e, dependendo da sua concentração inicial no leite, podem degradar a κ -caseína, originando peptídeos com peso molecular semelhante ao do CMP (Alvim, 1992). A quantidade de CMP formada durante o armazenamento de leite integral a 4°C e inoculado com *Pseudomonas fluorescens* 22F foi estudada por Olieman e Van den Bedem (1983). Foi observada a formação de CMP nesse leite com contagens de microrganismos viáveis acima de 3×10^5 UFC/mL.

Olieman e van Riel (1989) observaram que a fermentação do leite desnatado por diversos fermentos lácticos, empregados na produção de manteiga, não forneceram nenhuma indicação de formação de CMP por meio do método de cromatografia líquida de alta eficiência-fase reversa (CLAE-FR). Alguns fermentos liberavam “pseudo-CMP” (CMP com ausência do aminoácido metionina). Os autores constataram, também, que a inoculação de bactérias psicrotróficas em

proporções elevadas resultava na produção de “pseudo-CMP”. Os resultados obtidos demonstraram que a técnica de CLAE-FR permite que se quantifique o CMP, isoladamente de outros peptídeos, com elevada seletividade, não sendo encontrada evidência de que os fermentos utilizados produzam enzimas que possam fragmentar a κ -caseína na mesma região em que a renina possui especificidade. O limite de detecção foi de 0,2% de sólidos de soro lácteo em pó (m/m), sendo o método considerado como oficial pelo MCE, em 1990.

Alvim (1992) inoculou fermentos lácticos em leite esterilizado visando definir a capacidade dos mesmos de fragmentar as caseínas do leite e liberar peptídeos que pudessem induzir a erros de interpretação nos resultados da CLAE. O autor concluiu que as bactérias de fermentos lácticos não produzem enzimas capazes de fragmentar as caseínas do leite em peptídeos de peso molecular semelhante ao do CMP.

O efeito da estocagem de leite cru sem adição de soro lácteo a 4°C e a 10°C sobre a análise pelo método da CLAE-FG foi avaliado por Alvim (1992). Foi observado que, a partir de 48 horas de estocagem a 10°C, houve a indicação da presença de soro lácteo em amostras de leite. A ocorrência desse falso resultado positivo, registrado como um pequeno pico no mesmo tempo de retenção do CMP, foi devida à presença e à atuação de proteases produzidas por bactérias de natureza psicrotrofica, sobre as caseínas do leite, liberando peptídeos que eram separados no mesmo tempo de retenção do CMP. Outro teste realizado nesse trabalho foi a inoculação de *Pseudomonas fluorescens* em amostras de leite cru e esterilizado, estocados a 4, 7 e 10°C. A partir de 48 horas de estocagem a 4°C, o leite cru inoculado com esta bactéria já apresentava ocorrência de reações proteolíticas com conseqüente liberação de peptídeos com volume hidrodinâmico semelhante ao do CMP, correspondente a

adição de 0,8% de soro lácteo. A atividade proteolítica foi crescente, ao longo do período de estocagem, quando foi encontrado até 26% de indicativo da presença de soro lácteo em leite esterilizado estocado a 10°C e inoculado com *Pseudomonas fragi*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho consistiu de dois experimentos, sendo o primeiro realizado com o intuito de caracterizar as bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais, em relação aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. O segundo experimento teve como objetivo verificar se a metodologia oficial recomendada para pesquisa de CMP em leite fluido e leite em pó pode ser utilizada para bebidas lácteas fermentadas.

3.1- Avaliação físico-química e microbiológica de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais

3.1.1- Coleta das amostras para análises físico-químicas e microbiológicas

As amostras de bebidas lácteas fermentadas foram adquiridas em grandes redes de supermercados localizados em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período de janeiro a abril de 2009. A escolha de grandes redes de supermercados para a coleta das amostras foi devida a maior confiabilidade de armazenamento das mesmas nesses estabelecimentos. Assim, não seria observada interferência de armazenamento inadequado na qualidade dos produtos e esta refletiria as condições de processamento na indústria. Foram analisadas cinco marcas distintas, inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Para cada marca analisada foram coletadas oito amostras de diferentes lotes, totalizando 40 amostras. As

mesmas foram, então, conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, onde ficaram armazenadas sob refrigeração a 8-10°C em refrigerador (Ormifrio Ltda GCI004, Sabará, MG, Brasil) até a última semana do prazo final de validade, quando as análises foram procedidas. Após as análises microbiológicas, as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Físico-química do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG para a realização das análises físico-químicas.

3.1.2- Avaliação microbiológica das bebidas lácteas fermentadas

Foram avaliados os seguintes parâmetros microbiológicos: número mais provável de coliformes totais (30°C), número mais provável de coliformes termotolerantes (45°C), pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 mL, contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e contagem de bolores e leveduras. Foi, ainda, realizada a contagem total de bactérias lácticas viáveis. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.1.2.1- Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

A pesquisa de coliformes totais e termotolerantes foi feita utilizando o método do Número Mais Provável (NMP). Na Prova Presuntiva, 1 mL da amostra e das diluições decimais 10^{-1} e 10^{-2} , preparadas com água peptonada 0,1%, foram inoculadas em triplicata em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA) 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 indicava resultado positivo e requeria a realização do teste confirmatório em ágar Levine (Acumedia Manufactures

Inc., Lansing, Michigan, EUA) para coliformes totais e caldo *Escherichia Coli* (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA) para coliformes termotolerantes (International..., 1974). O NMP foi determinado pela tabela de Mc Crady (Feng *et al.*, 2002).

3.1.2.2- Pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 mL

A pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 mL foi feita seguindo-se as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e seleção, identificação bioquímica e sorologia (Brasil, 2003). O pré-enriquecimento baseou-se na incubação, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas, de $25 \pm 0,2$ mL da amostra, adicionada de 225 mL de solução de água peptonada 1,0%. Para o enriquecimento seletivo, foram utilizados o caldo Rappaport Vassiliadis (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA) e caldo selenito-cistina (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA), ambos incubados à temperatura de $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas. Para o isolamento e seleção, foram utilizados o ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose ou BPLS (Isofar Indústria e Comércio, Duque de Caxias, RJ, Brasil), o ágar Hecktoen (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA) e o ágar *Salmonella-Shigella* (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA), todos incubados a 37°C por 24 horas. A identificação bioquímica foi procedida utilizando-se o meio Instituto Adolfo Lutz ou IAL (Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil) incubado a 37°C por 24 horas. Para a prova de soroaglutinação, foi utilizado anti-soro para *Salmonella* polivalente "O" (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA).

3.1.2.3- Contagem de *Staphylococcus coagulase positivo*

A contagem de *Staphylococcus coagulase positivo* baseou-se na inoculação de 0,1 mL da amostra e das diluições decimais 10^{-1} e 10^{-2} em ágar Baird-Parker (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA) suplementado com gema de ovo e telurito de potássio. Os inóculos foram espalhados com auxílio da alça de Drigalski sobre a superfície do ágar e, em seguida, incubados a 36°C por 48 horas. As colônias que apresentaram halos de transparência e precipitação foram ativadas em caldo *Brain Heart Infusion* ou BHI (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA) e submetidas à prova da coagulase (Brasil, 2003).

3.1.2.4- Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras baseou-se na inoculação de 0,1 mL da amostra e das diluições decimais 10^{-2} e 10^{-4} em ágar batata glicose 2% (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EUA), acidificado pela adição de ácido tartárico (Ecibra, São Paulo, SP, Brasil) 10% até pH 3,5. Os inóculos foram espalhados com auxílio da alça de Drigalski sobre a superfície do ágar e, em seguida, as placas foram incubadas a 25 ± 1°C por sete dias (Brasil, 2003).

3.1.2.5- Contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis

Para a contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis, foram preparadas diluições decimais de 10^{-3} a 10^{-6} das bebidas lácteas fermentadas utilizando-se água peptonada 0,1%. As contagens foram obtidas pelo método de plaqueamento em profundidade ou *pour plate*, adicionando-se 1 mL de inóculo em placas de Petri e, em seguida, vertendo-se de 15 a 20 mL do ágar fundido. Foram utilizados os ágares MRS (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e M17 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan,

EUA). As placas de ágar MRS foram incubadas a 37°C durante 72 horas em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂. As placas de ágar M17 foram incubadas a 37 °C em aerobiose por 48 horas. Após os referidos tempos de incubação, a contagem foi realizada em placas cujas diluições apresentaram entre 10 e 300 colônias para ambos os meios de cultura. A enumeração dos microrganismos foi, então, obtida pela multiplicação do número de colônias pelo inverso da diluição para cada um dos meios, e em seguida, foi realizada a soma das contagens no ágar MRS e no ágar M17 para obtenção da contagem total (International..., 1988).

3.1.2.5.1- Purificação, testes morfológicos e bioquímicos e manutenção dos microrganismos isolados

As colônias de bactérias ácido-lácticas de tipos morfológicos diferentes encontradas nas cinco marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas, que cresceram em ágar MRS foram inoculadas em 3,0 mL de caldo MRS (*Difco*) e incubadas a 37°C, durante 72 horas, em câmara anaeróbica. As colônias de tipos morfológicos diferentes encontradas nas cinco marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas oriundas do ágar M17 foram inoculadas em 3,0 mL de leite desnatado em pó da marca Molico (Nestlé®, Araçatuba, SP, Brasil), reconstituído a 10%, e incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose. A partir de colônias de bactérias ácido-lácticas isoladas dos meios ágar M17 e MRS, foram feitos esfregaços em lâminas para coloração pelo método de Gram e teste de catalase, em lâmina, utilizando-se H₂O₂ a 30%. Após o crescimento, uma alíquota de 800 µL de cada tubo foi transferida para tubo *ependorf* e adicionada de glicerol esterilizado (200 µL), sendo em seguida congelada a -18°C para posterior utilização. O restante dos cultivos foi destinado à

biologia molecular, com a finalidade de identificação das espécies isoladas, por intermédio de análise de restrição do ácido desoxirribonucléico ribossomal (rDNA) amplificado por reação de polimerização em cadeia (PCR) da região espaçadora 16S-23S do rDNA (ARDRA) conforme metodologia proposta por Moreira *et al.* (2005), Tannock *et al.* (1999) e Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997).

3.1.3- Identificação de bactérias ácido-láticas por meio de técnicas de Biologia Molecular

A extração do DNA total dos microrganismos isolados nos meios de cultura ágar MRS e ágar M17 foi realizada a partir do cultivo recente em caldo MRS (*Difco*) e caldo M17 (*Difco*) suplementado com solução de lactose 10%, incubados em anaerobiose por 72 horas e aerobiose por 48 horas, respectivamente a 37°C, como descrito anteriormente.

3.1.3.1- Obtenção de células sem parede e sem membrana

De cada cultivo dos microrganismos que cresceram em caldo MRS e caldo M17, 10 mL foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C, para obtenção dos *pellets*. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 1 mL de cloreto de lítio (1M) e incubados sob agitação à 37°C, por uma hora, com a finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 10 minutos, descartando-se os sobrenadantes. Os *pellets* foram ressuspensos em 1mL de tampão para protoplastos (50mM Tris HCl pH 8,0; 10mM EDTA; 10mg de lisozima mL⁻¹) e incubados por uma hora, sob agitação a 37°C. Os *pellets* ressuspensos foram transferidos para tubos *epENDORF* e centrifugados a 14.000 rpm, durante um

minuto, e os sobrenadantes foram descartados.

3.1.3.2- Extração de DNA total

O DNA total dos protoplastos obtidos de cada amostra foi extraído com auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, EUA), segundo instruções do fabricante.

3.1.3.3- Eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. 5 µL de cada amostra de DNA total extraído foram misturados a 1 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol). Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%, adicionado de 5 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, durante 50 minutos. No mesmo gel, foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1 Kb. Ao término da corrida, os géis foram fotografados por meio de equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta.

3.1.3.4- Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Posteriormente, as amostras de DNA total foram submetidas à reação de polimerização em cadeia (PCR), visando amplificar a região intergênica que codifica as sub-unidades ribossomais, 16S – 23S, conforme metodologia proposta por Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997). Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de microrganismos, porém, bastante conservada em microrganismos do mesmo gênero, sendo então utilizada em pesquisas de identificação microbiana, por meio de biologia molecular. Os volumes de cada um dos componentes da reação de PCR 16S-23S estão esquematizadas no Quadro 2. Em seguida, os tubos *epENDORF*, contendo as

amostras foram colocados dentro da máquina termocicladora *Veriti™ 96 – Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, City Foster, Califórnia, EUA) e o programa utilizado encontra-se especificado no Quadro 3.

Posteriormente, 4 µL de cada produto de PCR foram misturados com 1 µL do tampão glicérol com azul de bromofenol, e então, foram submetidos à nova eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionados de 5 µL de brometo de etídeo, utilizando 100V, durante 50 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas.

3.1.3.5- Restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rDNA com endonucleases específicas (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – ARDRA)

Após a obtenção dos produtos de PCR, aqueles que apresentaram padrão de 3

bandas de DNA, sugestivo de espécies do gênero *Lactobacillus*, quando visualizados em gel de agarose 1,4%, foram submetidos à ação de endonucleases (ARDRA), de acordo com compilação de seqüências de nucleotídeos disponíveis no *GenBank* para a identificação das espécies do gênero *Lactobacillus*. As enzimas utilizadas foram: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, que clivam o gene 16S; *SspI*, *SfuI*, *DraI*, *VspI*, *EcoRI* que clivam a região espaçadora; *HincII*, *AvrII* e *HindIII*, que clivam o gene 23S. Também foi utilizada a enzima *EcoRV*, que cliva o DNA de *Lactobacillus* do grupo casei na região intergênica 16S-23S e dentro do gene 23S no grupo acidófilo. Todas as enzimas utilizadas foram adquiridas da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, EUA). Algumas destas enzimas necessitaram de albumina sérica bovina (BSA) para sua melhor atividade. Desta forma, foram preparadas duas misturas diferentes, de acordo com o Quadro 4.

Quadro 2- Componentes da reação de PCR 16S-23S e seus respectivos volumes

DNA total diluído	5,0 µL
PCR Master Mix 2x*	30 µL
Iniciador senso (16S) **	0,6 µL
Iniciador reverso (23S) ***	0,6 µL
Água deionizada	23,8 µL

* *Promega Corporation*

***Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'*

****Primer 23-1b. 5' – GGGTCCCCCATTCGGA – 3'*

Quadro 3- Programa utilizado na máquina termocicladora para PCR 16S-23S

<i>Desnaturação</i>	95° C	2 minutos e 30 segundos
	94° C	30 segundos
<i>Anelamento</i>	55° C	1 minuto
<i>Extensão</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensão final</i>	72° C	10 minutos
	4° C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento e extensão: 35.

Quadro 4- Componentes e volumes das misturas com e sem BSA

Mistura 1 – com BSA	
DNA (Produto de PCR)	3,5 µL
Tampão 10 x	1,0 µL
BSA 10 x	1 µL
Água deionizada	3,9 µL
Enzima	0,1 µL
Mistura 2- sem BSA	
DNA (Produto de PCR)	3,5 µL
Tampão 10 x	1,0 µL
Água deionizada	4,9 µL
Enzima	0,1 µL

Após o preparo dos tubos, os mesmos foram mantidos à 37°C, durante duas horas, para proceder à análise de restrição enzimática. Em seguida, 9,5 µL de cada produto de restrição foram misturados com 2 µL do tampão glicerol com azul de bromofenol, e então submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionado de 5 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 50 minutos. Os resultados foram fotografados e o perfil de restrição de cada produto de PCR foi comparado com o perfil de restrição característico de cada espécie do gênero *Lactobacillus*.

3.1.4- Avaliação físico-química das bebidas lácteas fermentadas

Em seguida às análises microbiológicas, foram procedidas as análises físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas. Em cada amostra, foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: umidade e voláteis, sólidos totais, teor de proteína, teor de gordura, pH e acidez (Brasil, 2006). O pH foi determinado por meio de pHmetro digital (Hanna Instruments, São Paulo, SP, Brasil). O teor percentual de gordura foi obtido pelo método butirométrico para leite fluido. Os teores percentuais de umidade e voláteis e sólidos totais foram determinados em estufa (Biopar - Equipamentos Eletro-eletrônicos

Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil) e balança (Shimadzu AY220, São Paulo, SP, Brasil). O teor percentual de proteínas foi determinado pelo método Micro-Kjedahl, no equipamento Tecnal (TE012, Piracicaba, SP, Brasil). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.1.4.1- Comparação dos métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb (Mojonnier) para análise do teor percentual de gordura das bebidas lácteas fermentadas

O teor percentual de gordura de trinta amostras de bebidas lácteas fermentadas, referentes às cinco marcas comerciais coletadas, foi determinado por meio de dois métodos: o butirométrico para leite fluido (Brasil, 2006) e o de Roesse-Gottlieb, também conhecido como método de Mojonnier (Brasil, 2006). As análises foram conduzidas em duplicata. As amostras permaneceram armazenadas a -18°C até o momento das análises. Essas análises foram realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), localizado em Pedro Leopoldo, em junho de 2009.

3.1.5- Análise estatística

Para os parâmetros microbiológicos, foi realizada a análise estatística descritiva. Para os parâmetros físico-químicos, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. A comparação de médias foi feita utilizando-se a análise estatística paramétrica e foi aplicado o teste de Student-Newman-Keuls, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002) por meio do programa SAS, versão 8.0 (SAS Institute Inc, Cary, Carolina do Norte, EUA). Para a comparação dos teores percentuais médios de gordura de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidos pelos métodos butirométrico para leite fluido e Mojonnier, utilizou-se a análise estatística paramétrica e foi aplicado o teste t de Student, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002) por meio do programa SAS, versão 8.0 (SAS Institute Inc, Cary, Carolina do Norte, EUA).

3.2- Detecção de soro lácteo e CMP em bebidas lácteas fermentadas utilizando CLAE-FG

3.2.1- Preparo dos leites e das bebidas lácteas fermentados

As amostras de leite e de bebidas lácteas fermentados utilizadas para a detecção de soro lácteo e CMP por CLAE- FG foram preparadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, a partir de leite, soro lácteo e cultura de bactérias ácido-lácticas. Cada amostra de leite coletada foi subdividida em quatro partes, cada uma delas adicionada de diferentes teores de soro lácteo (0, 10, 20 e 40%). De cada uma dessas misturas, foram coletadas porções logo após o término da fermentação e com 7, 14 e 21 dias de armazenamento em refrigeração a 8-10°C.

3.2.1.1- Obtenção do leite

Os leites utilizados para preparo dos leites e bebidas lácteas fermentados foram obtidos nas fazendas da Escola de Veterinária da UFMG: a Fazenda Modelo, em Pedro Leopoldo e a Fazenda Professor Hélio Barbosa, em Igarapé, Minas Gerais, em julho de 2009. Ao todo, foram coletadas seis amostras de leite de origem diferente, oriundas de vacas individuais e mantidas sob refrigeração até o momento do processamento. O processamento dos mesmos se deu logo após a coleta para evitar a ocorrência de proteólise.

3.2.1.2- Obtenção do soro lácteo

O soro lácteo utilizado para o preparo das bebidas lácteas fermentadas foi soro em pó parcialmente desmineralizado (Alibra Ingredientes Ltda, Campinas, SP, Brasil) e reconstituído a 8,33% p/v (1 parte de soro em pó para 12 partes de água) em água destilada. Para controle de qualidade deste soro, foram realizadas análises do teor percentual de proteínas e do teor percentual de umidade e voláteis (Brasil, 2006). O Anexo 1 apresenta mais informações sobre o soro lácteo em pó utilizado.

3.2.1.3- Preparação da cultura láctica

A cultura mista liofilizada YF-L811 (Christian Hansen, Valinhos, SP, Brasil), contendo *Streptococcus thermophilus* subsp. *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi dissolvida assepticamente em um litro de leite em pó desnatado Molico (Nestlé®, Araçatuba, SP, Brasil), reconstituído a 12% p/v em água destilada, esterilizado a 110°C por 10 minutos e resfriado a 43°C. Em seguida, foi homogeneizada e alíquotas de 25 mL foram distribuídas em frascos esterilizados. Os frascos foram mantidos em *freezer* à temperatura de - 18°C. Na ocasião do uso, as culturas foram descongeladas e inoculadas diretamente no leite e nas misturas de leite e

soro lácteo, para a fabricação dos leites e bebidas lácteas fermentados.

40% de soro adicionado) e leite fermentado (0% de soro adicionado).

3.2.1.4- Misturas de leite e soro lácteo

Após a reconstituição do soro lácteo em pó, foram preparadas as misturas deste ingrediente com o leite. O volume total das misturas foi de 200 mL. O quadro 5 exibe as proporções de soro lácteo e leite utilizados em cada uma das misturas, de modo a se obter bebidas lácteas fermentadas (10, 20,

Em seguida, os leites e as misturas de leite e soro lácteo foram submetidos à pasteurização em banho-maria, sob agitação constante. O binômio tempo/ temperatura empregado foi 85°C por 30 minutos. Posteriormente, os leites e as misturas foram resfriados em água com gelo, até temperatura de 43°C para inoculação da cultura de iogurte.

Quadro 5- Proporções de soro lácteo e leite utilizados de modo a se obter misturas com teores de soro lácteo de 10, 20 e 40% e leite sem adição de soro, para um volume final de 200 mL

Volume de soro lácteo adicionado (mL)	Volume de leite adicionado (mL)	Volume final (mL)	Teor de soro lácteo na mistura (%)
0	200	200	0
20	180	200	10
40	160	200	20
80	120	200	40

3.2.1.5- Inoculação da cultura de iogurte nas misturas de leite e soro lácteo e fermentação

Para cada 200 mL de leite ou da mistura de leite e soro lácteo, foram inoculados 800 µL da cultura de iogurte em condições assépticas. Em seguida, os leites e as misturas adicionados da cultura foram incubadas em banho-maria a 44,5°C por cerca de quatro horas ou até apresentarem pH igual ou menor do que 4,6 e acidez titulável acima de 60°D (Brasil, 2006). Terminada a fermentação, foi feita a quebra do coágulo, durante 30 segundos por agitação manual. Foram, então, retiradas alíquotas de, aproximadamente, 50 mL do leite e das bebidas lácteas fermentados, de forma asséptica, e congeladas a -18°C. Em seguida à retirada da primeira alíquota das misturas, logo após a fermentação, as mesmas foram armazenadas sob refrigeração a 8-10°C. Posteriormente, foram retiradas mais três alíquotas de cada uma delas, de aproximadamente 50 mL, em condições

assépticas, após 7, 14 e 21 dias de acondicionamento em refrigerador. Essas alíquotas foram imediatamente congeladas a -18°C para, posteriormente, serem encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, para análise por CLAE-FG.

3.2.2- Preparo da curva de calibração do equipamento de cromatografia

Foram preparadas duas curvas de calibração para análise das bebidas lácteas fermentadas por CLAE, sendo uma delas com padrões de soro lácteo e a outra com padrões de CMP. Para a confecção de ambas as curvas, foi utilizado leite em pó desnatado isento de soro lácteo, reconstituído a 10% em água destilada, fornecido pelo LANAGRO-MG e também utilizado por este laboratório para esta finalidade. Para a obtenção da curva de soro lácteo, foi utilizado o mesmo soro em pó parcialmente desmineralizado empregado no preparo das bebidas lácteas fermentadas,

reconstituído na mesma proporção em água destilada. Em seguida, foram realizadas misturas de leite e soro lácteo em diferentes proporções, considerando um volume total de 20 mL, como demonstra o quadro 6. Desta forma, foram obtidos os padrões de 5, 10, 20, 40 e 50% de soro lácteo adicionado, além da amostra branca, isenta de soro. O Anexo 2 mostra a sobreposição dos padrões de soro lácteo que foram utilizados para a construção da curva de calibração.

Para a obtenção da curva de CMP, foi utilizado um padrão com 89,72% de pureza. Foi pesada uma alíquota de 0,0279g desse

composto, que em seguida, foi dissolvida em cerca de 5 mL de leite, transferida para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume. Depois da homogeneização desta mistura, foram transferidos, com auxílio de micropipeta regulável, alíquotas de 150, 300, 450, 600, 750 e 900 μ L para balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com leite, seguido de homogeneização da mistura. Dessa forma, foram preparadas soluções padrão de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 mg/L de CMP, além do branco, isento de CMP.

Quadro 6- Proporções de soro lácteo e leite utilizados de modo a se obter misturas com teores de soro lácteo de 5, 10, 20, 40 e 50% e leite sem adição de soro (amostra branca) para preparo da curva de calibração

Volume de soro lácteo adicionado (mL)	Volume de leite adicionado (mL)	Volume final (mL)	Teor de soro lácteo na mistura (%)
0	20	20	0
1	19	20	5
2	18	20	10
4	16	20	20
8	12	20	40
10	10	20	50

O Anexo 3 exibe a sobreposição dos padrões de CMP que foram utilizados para a construção da curva de calibração.

Para a precipitação da curva, foi necessário um volume de 10 mL de cada um desses padrões de soro lácteo e CMP. À este volume, adicionou-se, com auxílio de bureta, 5 mL de solução de TCA 24%, sob agitação constante, em um intervalo de dois minutos. Foi então feito um repouso de 60 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, filtrou-se essas soluções, em papel de filtro qualitativo, descartando as primeiras gotas. Foram injetados 20 μ L de cada filtrado no cromatógrafo (Shimadzu CLASS VP 6.1) com coluna (Zorbax GF 250 Bioséries da Agilent) cujo princípio de separação se baseia na exclusão molecular,

com fluxo de fase móvel de 1,5 mL por minuto (bombeamento isocrático de solução tampão fosfato pH 6,0) e detecção por UV visível no comprimento de onda de 205 nm. A partir dos resultados obtidos, construíram-se gráficos de porcentagem de soro *versus* a intensidade do sinal detector e concentração de CMP *versus* a intensidade do sinal detector e calculadas as equações de regressão, cujas retas devem apresentar valores de R^2 maior que 0,95 (Brasil, 2006).

3.2.3- Procedimento de análise

Foram transferidos, com pipeta volumétrica, 10 mL de cada uma das amostras de leites e bebidas lácteas fermentados a serem analisadas para béquer de 50 mL. À amostra, adicionou-se 5 mL de solução de TCA 24%, sob agitação constante, em um intervalo de dois minutos. Após repouso de 60 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo e as primeiras gotas descartadas. Foram injetados 20 µL de cada filtrado no cromatógrafo, com fluxo da fase móvel de 1,5 mL por minuto (Brasil, 2006).

3.2.4- Cálculos

Os cromatogramas das amostras foram comparados com os cromatogramas da curva de calibração, sendo identificado o pico com tempo de retenção semelhante. A porcentagem de soro e a concentração de CMP das amostras foram calculadas por interpolação da leitura do sinal nas retas de regressão geradas pelas curvas de calibração de soro e de CMP, utilizando a seguinte equação: $y = ax + b$

Em que: x = concentração em % de soro ou mg/L de CMP

y = área do pico

a = inclinação da reta

b = intersecção com o eixo y , ou seja,

concentração em % de soro ou mg/L de

CMP = $\frac{\text{área do pico} - b}{a}$

3.2.5- Análise estatística

Esse experimento foi realizado utilizando delineamento em blocos casualizados, com arranjo em parcelas subdivididas. Cada lote de leite representou um bloco, as concentrações de soro lácteo (0, 10, 20 e 40%) foram consideradas as parcelas e os tempos de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias) as subparcelas. Para a comparação de médias, utilizou-se a análise estatística paramétrica e foi aplicado o teste de

Student-Newman-Keuls, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002) por meio do programa SISVAR, versão 5.0 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Avaliação físico-química e microbiológica de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais

4.1.1- Avaliação microbiológica das bebidas lácteas fermentadas

4.1.1.1- Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

Dentre as quarenta amostras de bebidas lácteas fermentadas referentes às cinco marcas comerciais analisadas, apenas uma (2,5%) apresentou 0,3 NMP/mL de coliformes totais. Nas demais amostras, foram encontradas contagens menores que 0,3 NMP/mL de coliformes totais e, em todas elas contagens menores que 0,3 NMP/mL de coliformes termotolerantes. Esses resultados indicam qualidade higiênico-sanitária adequada durante todo o processo de produção e armazenamento das bebidas lácteas fermentadas. Além disso, os resultados apresentados demonstram qualidade microbiológica superior à exigida no RTIQ de Bebida Láctea para bebidas lácteas fermentadas (Brasil, 2005), no qual são permitidas contagens de até 100 NMP/mL de coliformes totais e 10 NMP/mL de coliformes termotolerantes para amostras indicativas, o que pode ser visualizado na tabela 2.

Rodrigues e Santos (2007), ao analisarem quatorze amostras de bebidas lácteas fermentadas de marcas distintas oriundas de Uberlândia, Minas Gerais, não encontraram coliformes termotolerantes em nenhuma delas, estando as mesmas de acordo com o

padrão preconizado pela legislação. Tebaldi *et al.* (2007) realizaram análises microbiológicas de vinte amostras de bebidas lácteas fermentadas de cinco marcas distintas obtidas no comércio da micro-região de Lavras, Minas Gerais. Essas

amostras foram analisadas aproximadamente cinco dias antes do término do prazo de validade. Em nenhuma delas foram encontrados coliformes totais e termotolerantes.

Tabela 2- Conformidade das amostras de bebidas lácteas fermentadas em relação aos padrões do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea para as pesquisas de coliformes totais e termotolerantes

Análise	Amostras em conformidade com legislação
Pesquisa de coliformes totais	100%
Pesquisa de coliformes termotolerantes	100%

Pinto *et al.* (2009), ao analisarem quinze amostras de bebidas lácteas fermentadas de três marcas distintas comercializadas em Viçosa, Minas Gerais, observaram a presença de coliformes termotolerantes em uma das marcas avaliadas. Soares *et al.* (2009) analisaram vinte amostras de bebidas lácteas fermentadas de lotes diferentes pertencentes a oito marcas distintas coletadas em estabelecimentos comerciais de Mossoró, Rio Grande do Norte. Foi verificado que quatro amostras (20%) se encontravam fora dos padrões para coliformes termotolerantes, por apresentarem contagens acima do valor permitido pela legislação em vigor. Mesmo estando dentro do limite legal, a presença desses microrganismos no produto final, pode ser indicativa de más condições higiênicas-sanitárias durante seu processo de elaboração. Além disso, a presença de coliformes termotolerantes está associada à contaminação da amostra por microrganismos entéricos patogênicos como *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* O157:H7.

4.1.1.2- Pesquisas de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo

Em todas as amostras analisadas foi observada ausência de *Salmonella* spp. em 25 mL e contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo menores do que 10 UFC/mL, como pode ser observado no

quadro 7. No RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) não é exigida a pesquisa desses microrganismos para bebidas lácteas fermentadas. No entanto, a ANVISA, por meio da Resolução RDC nº12, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, estabelece que *Salmonella* spp. deve estar ausente em amostras indicativas desses produtos (Brasil, 2001). Esta bactéria deve estar ausente em alimentos, tendo em vista que se trata de um patógeno, potencial causador de toxinfecção para o homem, representando um perigo à saúde pública. Devido às suas características, *Staphylococcus* spp. exibem uma alta capacidade de contaminação e produção de toxinas nos alimentos, expondo a população consumidora ao risco de desenvolvimento de uma toxinfecção alimentar. Por isso, as legislações mundiais que versam sobre os parâmetros microbiológicos de alimentos preconizam a pesquisa de estafilococos coagulase-positivo, pois esta enzima apresenta correlação com a produção de toxinas. Contudo, já foi demonstrada por diversos pesquisadores a produção desses metabólitos por espécies coagulase negativo (Sena, 2000; Veras, 2004; Santos, 2008). Pinto *et al.* (2009) não encontraram *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras de bebidas lácteas fermentadas representativas de três marcas avaliadas, resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho.

4.1.1.3- Contagem de bolores e leveduras

Dentre as amostras analisadas, apenas uma (2,5%) apresentou contagem de $2,4 \times 10^4$ UFC/mL para bolores e leveduras. Nas demais amostras, foram encontradas contagens menores que 10 UFC/mL, como pode ser observado no quadro 7. Esses resultados demonstraram que não ocorreu contaminação ambiental, contaminação das embalagens e dos ingredientes utilizados ou contaminação por manipulação com esses microrganismos na maior parte das bebidas lácteas fermentadas analisadas. Além disso, as mesmas foram adicionadas de sorbato de potássio, que previne o crescimento de bolores e leveduras. A amostra que apresentou contagem de $2,4 \times 10^4$ UFC/mL aponta para a ocorrência de um problema de contaminação isolado, que não é freqüente. No RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) não é exigida a pesquisa de bolores e leveduras para bebidas lácteas fermentadas. Rodrigues e Santos (2007) observaram que 28,57% das bebidas lácteas fermentadas analisadas estavam contaminadas com bolores e leveduras. Isso indica falhas na aplicação das Boas Práticas de Fabricação durante o processo de produção, que pode reduzir a vida útil dos produtos e colocar em risco a saúde do consumidor. Tebaldi *et al.* (2007) não detectaram a presença de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de bebidas lácteas fermentadas analisadas, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. Pinto *et al.* (2009) verificaram que todas as marcas de bebidas lácteas fermentadas apresentaram amostras com contagens elevadas de bolores e leveduras, indicando que não foram produzidas adequadamente.

Os fungos são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os alimentos, provocam sua deterioração. Além disso, um grande número de fungos produz substâncias tóxicas denominadas micotoxinas que, contaminando alimentos, tornam os mesmos prejudiciais ao organismo do homem, produzindo micotoxicoses. A presença de leveduras também é indicativa de condições higiênico-sanitárias deficientes, falhas no processamento e/ou na estocagem e matérias-primas ou embalagens com contaminação inicial excessiva.

4.1.1.4- Contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis

Em duas das cinco marcas comerciais de bebidas lácteas fermentadas analisadas, foram observadas contagens totais de bactérias ácido-lácticas viáveis acima de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL em todas as repetições. Em outras duas marcas avaliadas, apenas uma repetição de cada uma delas apresentou contagem inferior a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL, sendo as mesmas $2,66 \times 10^8$ e $1,79 \times 10^8$ UFC/mL. A outra marca averiguada apresentou duas repetições com contagens inferiores a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL, sendo estas de $2,24 \times 10^8$ e $5,4 \times 10^7$ UFC/mL. A Tabela 3 apresenta essa distribuição. Esses resultados demonstram qualidade microbiológica superior à exigida no RTIQ de Bebida Láctea para bebidas lácteas fermentadas (Brasil, 2005), no qual é exigida a contagem mínima de 10^6 UFC/mL de bactérias ácido-lácticas totais durante todo o prazo de validade.

Quadro 7- Resultados das pesquisas de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e contagem de bolores e leveduras

Análise	Situação das amostras
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 100%*
Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	< 10 UFC/mL em 100%
Contagem de bolores e leveduras	1 amostra (2,5%) - $2,4 \times 10^4$ UFC/mL 39 amostras (97,5%) - < 10 UFC/mL

*Conformidade com Resolução RDC nº12 da ANVISA

Tabela 3- Número de repetições de bebidas lácteas fermentadas que apresentaram contagens de bactérias ácido-láticas viáveis acima e abaixo de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL dentro de cada marca avaliada

Marcas	Repetições com contagens > $3,0 \times 10^8$ UFC/mL	Repetições com contagens < $3,0 \times 10^8$ UFC/mL	Total
1	7	1	8
2	7	1	8
3	8	0	8
4	6	2	8
5	8	0	8

Ao realizarem a contagem de bactérias ácido-láticas utilizando ágar MRS, Rodrigues e Santos (2007) verificaram que todas as amostras de bebidas lácteas fermentadas apresentaram contagens acima do mínimo estabelecido pela legislação, resultados que condizem com os encontrados neste trabalho. No entanto, Tebaldi *et al.* (2007), utilizando ágar MRS para a contagem total de bactérias ácido-láticas constataram que apenas uma marca atendeu ao padrão estabelecido pela legislação. As demais quatro marcas apresentaram contagens inferiores a 10^6 UFC/mL.

4.1.2- Avaliação físico-química das bebidas lácteas fermentadas

4.1.2.1- Teor percentual de gordura

A tabela 4 apresenta os teores percentuais médios de gordura das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas.

De acordo com os resultados expressos na tabela 4, apenas a marca 4 apresentou diferença no teor percentual médio de gordura ($p < 0,05$), sendo este inferior em relação aos valores das demais marcas analisadas. O RTIQ de Bebida Láctea não estabelece padrão para o teor de gordura de bebidas lácteas fermentadas.

No entanto, muitos consumidores estão modificando seus hábitos alimentares em função da saúde e preferindo alimentos com redução na quantidade de gordura. Assim as bebidas lácteas fermentadas da marca 4 se destacam por apresentar reduzido teor de gordura em relação às outras marcas. É

possível observar ainda que os valores encontrados são menores que os encontrados para leite, pois a bebida láctea é caracterizada pela mistura de leite e soro lácteo e este último ingrediente apresenta reduzido teor de gordura em relação ao primeiro.

Tabela 4- Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) do teor percentual de gordura das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas

Marca	Teores médios de gordura (%) e desvios padrões	CV (%)
4	1,24 ^a ± 0,12	9,68
2	1,71 ^b ± 0,18	10,53
1	1,76 ^b ± 0,45	25,57
5	1,80 ^b ± 0,12	6,66
3	1,98 ^b ± 0,17	8,59

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05)

Almeida *et al.* (2001) elaboraram bebidas lácteas fermentadas com 30, 40 e 50% de soro lácteo. Ao verificarem o teor percentual de gordura das mesmas, esses autores encontraram os teores médios de 1,92, 1,76, e 1,59 %, respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho. Oliveira (2006), ao avaliar o teor de gordura de bebidas lácteas fermentadas preparadas com 10, 30 e 50% de soro lácteo e enriquecidas com ferro, estocadas por sete dias a 4°C, verificou que as mesmas apresentavam valores de gordura de 2,6, 2,0 e 1,6%, respectivamente. Os resultados encontrados por esse autor evidenciam que à medida que se aumenta a proporção de soro lácteo em relação ao leite, o teor de gordura diminui. Cunha *et al.* (2008) elaboraram uma bebida láctea com 30% de soro lácteo, fermentada mediante adição de cultura láctica termofílica contendo *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. O teor percentual médio de gordura encontrado para essa bebida láctea fermentada foi 1,91%, valor condizente com as médias encontradas neste trabalho.

4.1.2.2- Teor percentual de proteína

A tabela 5 apresenta os teores percentuais médios de proteína das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas.

Os resultados expressos na tabela 5 evidenciam que as marcas 3 e 4 apresentaram os teores percentuais mais elevados de proteína, sendo os mesmos equivalentes (p>0,05), porém diferentes (p<0,05) quando comparados às demais marcas analisadas. O requisito mínimo para teor de proteínas de bebidas lácteas fermentadas de acordo com o RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) é de 1,4% para bebidas lácteas fermentadas adicionadas de leite(s) fermentado(s) e 1,0% para bebidas lácteas fermentadas com adições ou bebida láctea fermentada com produto(s) ou substância(s) alimentícia(s).

Todos os teores percentuais médios de proteína encontrados são superiores aos valores mínimos preconizados pela legislação; no entanto, as marcas 4 e 3 se destacam por apresentar os mais elevados teores. Esse achado é de grande relevância, pois as bebidas lácteas fermentadas são

produtos frequentemente consumidos por crianças, que apresentam elevado requisito diário de proteína. Considerando, também, que a bebida láctea é caracterizada pela mistura de leite e soro lácteo e, este último

ingrediente apresenta reduzido teor de proteína em relação ao primeiro, os resultados obtidos se encontram bastante acima dos valores mínimos preconizados.

Tabela 5- Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) do teor percentual de proteína das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas

Marca	Teores médios de proteína (%) e desvios padrões	CV (%)
4	2,22 ^a ± 0,22	9,90
3	2,17 ^a ± 0,10	4,60
5	1,94 ^b ± 0,15	7,73
2	1,91 ^b ± 0,05	2,61
1	1,88 ^b ± 0,31	16,49

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05)

Almeida *et al.* (2001) obtiveram os teores médios de proteína de 2,14, 1,97 e 1,94% para bebidas lácteas fermentadas elaboradas com 30, 40 e 50% de soro lácteo, respectivamente. Esses valores são condizentes com os encontrados no presente trabalho. Chinelate *et al.* (2005) avaliaram o teor percentual de proteínas de bebidas lácteas fermentadas de seis marcas distintas adquiridas em estabelecimentos comerciais de Fortaleza, Ceará. Os valores médios obtidos para cada marca foram de 1,09, 1,15, 1,18, 1,22, 1,52 e 2,02%, sendo, de uma forma geral, inferiores aos obtidos neste trabalho. Thamer e Penna (2006), ao analisarem bebidas lácteas probióticas de diferentes formulações, encontraram teores de proteína variando entre 1,93 e 2,46%, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho. Oliveira (2006) também encontrou resultados semelhantes ao analisar o teor de proteína de bebidas lácteas fermentadas enriquecidas de ferro com diferentes concentrações de soro estocadas por sete dias a 4°C, com valores oscilando entre 1,65 a 2,08%. Cunha *et al.* (2008) encontraram o valor médio de 2,23% para o teor de proteína da bebida láctea fermentada elaborada com 30% de soro e fermentada mediante adição de cultura láctica

termofílica contendo *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*, resultado próximo aos das marcas 3 e 4, que exibiram o maior teor protéico dentre as marcas analisadas.

4.1.2.3- Acidez titulável

A tabela 6 apresenta os valores médios de acidez titulável das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas.

De acordo com a tabela 6, pode-se perceber que a marca 5 apresentou acidez titulável mais elevada (p<0,05) quando comparada com a marca 1. As médias de acidez titulável correspondentes às marcas 4, 2 e 3 são equivalentes tanto à média da marca 1 (p>0,05) quanto à média da marca 5 (p>0,05).

Não existe padrão para acidez titulável no RTIQ de Bebida Láctea para bebidas lácteas fermentadas. No entanto, as marcas 2, 3, 4 e 5 apresentam médias de acidez titulável em consonância com o RTIQ de Leites Fermentados (Brasil, 2007), que preconiza como acidez titulável mínima o valor de 60°D para leites fermentados. Esse achado

era esperado, tendo em vista que as amostras de bebidas lácteas fermentadas foram analisadas na última semana do prazo final de validade, estando portanto, na fase final de fermentação. Almeida *et al.* (2001) encontraram resultados semelhantes aos

deste trabalho para a acidez titulável de bebidas lácteas fermentadas com cultura de iogurte elaboradas com 30, 40 e 50% de soro lácteo armazenadas por 28 dias.

Tabela 6- Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) de acidez titulável (g de ácido láctico/ 100g) das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas

Marca	Acidez titulável média (%) e desvios padrões	CV (%)
5	0,66 ^a ± 0,047	7,12
4	0,65 ^{ab} ± 0,093	14,31
2	0,65 ^{ab} ± 0,026	4,00
3	0,61 ^{ab} ± 0,082	13,44
1	0,54 ^b ± 0,140	25,93

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05)

4.1.2.4- pH

A tabela 7 apresenta os teores médios de pH das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas. Os resultados apresentados na tabela 7 evidenciam que as marcas 2 e 5 apresentaram valores médios de pH mais baixos, que são equivalentes (p>0,05), quando comparados às demais marcas analisadas (p<0,05). O RTIQ de Bebida Láctea não estabelece padrão para o valor de pH de bebidas lácteas fermentadas. No entanto, pode-se observar que todas as marcas apresentaram pH médio inferior a 4,6, que é considerado o ponto isoeletrico da

caseína. Considerando que as amostras de bebidas lácteas fermentadas foram analisadas na última semana do prazo final de validade, valores de pH mais baixos eram esperados, tendo em vista que as mesmas se encontravam em fase final de fermentação. As diferenças nos valores de pH nos diferentes produtos podem estar relacionadas ao tipo e porcentagem de cultura utilizada, à atividade desta cultura, ao valor estabelecido para finalizar a fermentação, à quantidade de soro lácteo utilizado na elaboração das bebidas lácteas, à adição de diferentes ingredientes, assim como ao tempo de armazenamento (Thamer e Penna, 2006).

Tabela 7- Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) de pH das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas

Marca	pH médio e desvios padrões	CV (%)
2	3,91 ^a ± 0,06	1,53
5	3,94 ^a ± 0,11	2,80
1	4,05 ^b ± 0,12	2,96
3	4,11 ^b ± 0,12	2,92
4	4,16 ^b ± 0,10	2,40

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05)

Almeida *et al.* (2001), ao verificarem o pH de bebidas lácteas fermentadas elaboradas com 30, 40 e 50% de soro encontraram os valores médios de 4,63, 4,56 e 4,61, respectivamente. Esses valores são superiores aos descritos no presente trabalho, uma vez que foram aferidos logo após a fermentação das bebidas lácteas. Oliveira (2006), ao verificar o pH de bebidas lácteas fermentadas enriquecidas de ferro, preparadas com três concentrações diferentes de soro lácteo e estocadas por sete dias a 4°C, encontrou os valores de pH de 4,13 para as bebidas preparadas com 10 e 30% de soro lácteo e 4,20 para a bebida preparada com 50% de soro lácteo, que condizem com os encontrados neste trabalho.

Os baixos valores médios de pH apresentados podem ser justificados pelas elevadas contagens de bactérias ácido-lácticas encontradas nas amostras de bebidas lácteas fermentadas, sendo bastante superiores ao mínimo estabelecido pelo RTIQ de Bebida Láctea. No iogurte, *Streptococcus salivarius* subspécie *thermophilus* tende a ser inibido quando o pH atinge valores de 4,2 a 4,4, enquanto *Lactobacillus delbrueckii* subspécie *bulgaricus* pode tolerar valores de pH na faixa de 3,5 a 3,8 (Jay *et al.*, 2005). Esses baixos valores médios de pH encontrados também contribuíram para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis nas bebidas lácteas fermentadas.

4.1.2.5- Umidade e Sólidos totais

A tabela 8 apresenta os teores percentuais de umidade e sólidos totais das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas avaliadas.

De acordo com a tabela 8, pode-se observar que as marcas 2 e 5 apresentaram maior umidade média quando comparadas com as marcas 1 e 4, pois foi verificada diferença ($p < 0,05$). A média de umidade correspondente à marca 3 é equivalente tanto às médias das marcas 2 e 5 ($p > 0,05$) quanto às médias das marcas 1 e 4 ($p > 0,05$). As médias obtidas para sólidos totais corroboram com estes resultados. As marcas 2 e 5 apresentaram menor teor percentual de sólidos totais, que são equivalentes ($p > 0,05$), quando comparadas com as marcas 1 e 4, pois foi verificada diferença ($p < 0,05$). O valor médio de sólidos totais correspondente à marca 3 é equivalente tanto às médias das marcas 2 e 5 ($p > 0,05$) quanto às médias das marcas 1 e 4 ($p > 0,05$). O RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) não define critérios para os teores percentuais de umidade e extrato seco total, por isso, com base na legislação brasileira não é possível comparar os resultados descritos na Tabela 8. No entanto, as indústrias de laticínios cujas marcas foram avaliadas têm elaborado bebidas lácteas fermentadas utilizando aditivos como amido, estabilizantes e corantes. Desta forma, embora esteja estabelecida na legislação a concentração máxima no produto final de determinados aditivos, seria importante a definição de valores oficiais de teores de umidade e sólidos totais para a inspeção destes alimentos em relação a estes parâmetros de qualidade. Ainda em relação à esses parâmetros, pode-se observar que os valores encontrados para teor de umidade são menores que os encontrados para leite, ao passo que os valores encontrados para sólidos totais se mostram superiores. Isso também é explicado pelos aditivos utilizados na tecnologia de fabricação das bebidas lácteas, que ocasiona um incremento no teor de sólidos totais e contribui para diminuir o teor de umidade desses produtos.

Tabela 8- Resultados médios, desvios padrões e coeficientes de variação (CV) dos teores percentuais de umidade e sólidos totais das diferentes marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas

Marca	Umidade média (%) e desvios padrões	CV (%)	Sólidos totais médios (%) e desvios padrões	CV (%)
2	83,25 ^a ± 0,84	1,00	16,75 ^a ± 0,84	5,01
5	82,93 ^a ± 0,91	1,10	17,07 ^a ± 0,91	5,33
3	82,15 ^{ab} ± 1,50	1,83	17,85 ^{ab} ± 1,50	8,40
1	81,25 ^b ± 1,07	1,32	18,75 ^b ± 1,07	5,71
4	81,18 ^b ± 0,73	0,90	18,82 ^b ± 0,73	3,88

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05)

Chinelate *et al.* (2005) encontraram os valores médios de 13,89, 19,26, 17,85, 16,77, 18,60 e 15,77% para o teor de sólidos totais de seis marcas distintas de bebidas lácteas fermentadas, que condizem com os encontrados no presente trabalho. Oliveira (2006) verificou que os teores de umidade de bebidas lácteas fermentadas enriquecidas de ferro, preparadas com 10, 30 e 50% de soro lácteo e estocadas por sete dias a 4°C eram de 83,16, 83,51 e 85,06%, respectivamente. Os teores de umidade encontrados para as bebidas lácteas fermentadas adicionadas de 10 e 30% de soro lácteo foram próximos aos obtidos neste trabalho; no entanto, o teor encontrado para a bebida láctea fermentada adicionada de 50% de soro lácteo se mostrou superior. Cunha *et al.* (2008) encontraram os valores médios de 18,08% para sólidos totais e 81,91% para umidade de bebida láctea fermentada elaborada com 30% de soro lácteo e fermentada mediante adição de cultura láctica termofílica contendo *Streptococcus* contendo *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. Esses valores se mostraram bastante semelhantes aos encontrados neste trabalho.

4.1.2.6- Comparação dos métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb (Mojonnier) para análise do teor percentual de gordura das bebidas lácteas fermentadas

A tabela 9 apresenta os teores percentuais de gordura de trinta amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidos utilizando-se os métodos butirométrico para leite fluido e de Roesse-Gottlieb, também conhecido como Mojonnier, além dos teores percentuais médios para cada um desses métodos. De acordo com os dados contidos na tabela 9, não houve diferença (p>0,05) entre os métodos empregados para a aferição do percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas, indicando que qualquer um deles pode ser utilizado para verificação do teor percentual de gordura desse produto.

O método de Mojonnier é considerado oficial para análise do teor de gordura de bebidas lácteas. No entanto, o método butirométrico para leite fluido é mais prático e de mais fácil execução, o que justifica o fato da maioria dos trabalhos fazerem uso do segundo em detrimento do primeiro para aferição do teor de gordura de bebidas lácteas fermentadas (Almeida *et al.*, 2001; Oliveira, 2006; Thamer e Penna, 2006).

Tabela 9- Teores percentuais de gordura de trinta amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidos utilizando-se o método butirométrico para leite fluido e o método de Mojonnier e teores percentuais médios para cada um desses métodos

Amostras	Teor percentual de gordura	
	Mojonnier (%)	Butirométrico para leite fluido (%)
1	1,78	1,7
2	2,2	2,2
3	2,5	2,4
4	2,02	1,9
5	1,71	1,45
6	1,57	1,7
7	1,84	1,8
8	1,62	1,7
9	1,72	1,7
10	1,8	1,75
11	1,77	1,75
12	1,9	1,8
13	2,15	2,05
14	2,1	2,0
15	2,15	2,2
16	1,99	2,1
17	1,9	1,7
18	2,47	2,4
19	1,43	1,3
20	1,28	1,3
21	1,56	1,4
22	1,37	1,25
23	1,24	1,25
24	1,39	1,3
25	1,82	1,7
26	1,79	1,7
27	2,27	2,2
28	1,9	1,9
29	1,83	1,6
30	1,95	1,8
Médias	1,83 ^a	1,77 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste t ($p>0,05$)

Foi possível constatar uma alta correlação entre os teores de gordura obtidos para cada um dos métodos. O coeficiente de correlação entre essas variáveis foi de 96%, sendo o mesmo significativo ($p < 0,0001$). O seguinte modelo de regressão linear foi estabelecido para essas variáveis com base nos dados obtidos neste trabalho:

$Y = 0,93816X + 0,17659$, em que:

$R^2 = 92\%$

Y= Teor percentual de gordura obtido pelo método de Mojonnier

X= Teor percentual de gordura obtido pelo método butirométrico para leite fluido;

A Figura 2 apresenta o teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas obtido pelo método de Mojonnier de acordo com o teor percentual de gordura obtido pelo método butirométrico para leite fluido.

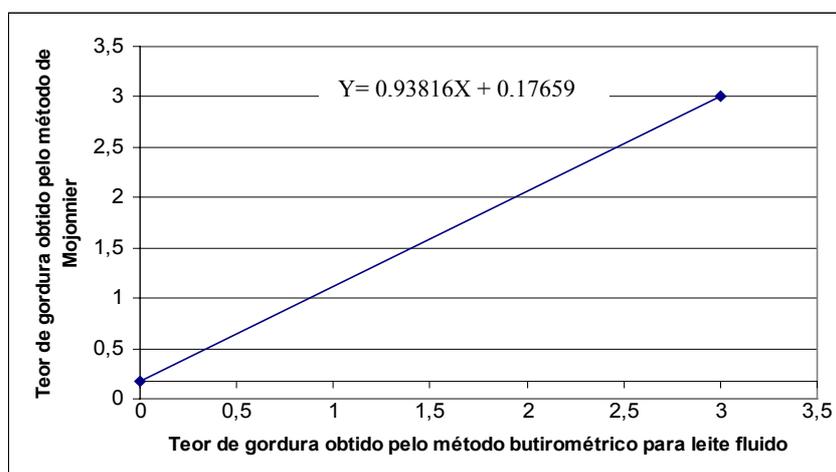


Figura 2- Teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas pelo método de Mojonnier segundo o teor obtido pelo método butirométrico para leite fluido

4.1.3- Identificação de bactérias ácido-lácticas por meio de técnicas de Biologia Molecular e características morfológicas e bioquímicas

Foram submetidas à identificação no nível molecular 36 amostras de microrganismos encontrados nas bebidas lácteas fermentadas das cinco marcas avaliadas. Dentre as 36 amostras, 13 eram oriundas do ágar M17 e 23 do ágar MRS.

Das 13 amostras do ágar M17, 12 (92,3%) apresentaram uma banda (amplificação de

uma ou mais cópias da região intergênica 16S-23S do DNA, porém com tamanhos semelhantes), o que sugere o isolamento de espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus*. Uma das amostras (7,7%) não foi amplificada na reação de polimerização em cadeia. Das 23 bactérias isoladas do ágar MRS, apenas quatro (17,39%) apresentaram três bandas (amplificação de três ou mais cópias da região intergênica 16S-23S do DNA, porém com tamanhos semelhantes), indicando se tratar de espécies do gênero *Lactobacillus*. Por outro lado, foi constatado que 16

(69,57%) amostras providas desse meio de cultura apresentaram banda da região intergênica 16S-23S em seu DNA, o que possivelmente indica que as mesmas pertencem ao gênero *Streptococcus*. Três amostras não foram amplificadas na reação de polimerização em cadeia. A Figura 3 mostra a distribuição total de amostras de bactérias produtoras de ácido láctico identificadas, considerando os dois meios de cultura utilizados.

O Anexo 4 apresenta a foto do gel de agarose relativo a PCR 16S-23S rDNA realizada para a amplificação desta região intergênica utilizada para a identificação dos microrganismos isolados. A análise do perfil de restrição dos quatro produtos da PCR 16S-23S (dois deles referentes a uma das marcas analisadas e os outros dois referentes a outras duas marcas) em que foi observado o perfil de três bandas sugestivo de espécies do gênero *Lactobacillus*, revelou que os mesmos se tratavam da espécie *Lactobacillus delbrueckii*. O Anexo 5 mostra a foto do gel de agarose após a

restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rDNA, utilizada para a identificação dos microrganismos do gênero *Lactobacillus* no nível de espécie.

A região intergênica 16S-23S representada como três bandas de DNA, com pesos moleculares diferentes, sugere material genético de bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus* spp., indicando que existem três versões diferentes (ou mais) destes genes no genoma destas bactérias. Isto ocorre porque uma banda pode representar uma ou mais regiões intergênicas com pesos moleculares semelhantes, amplificadas na reação de PCR. Como estes fragmentos de DNA apresentam velocidade de migração muito parecida durante a eletroforese, ao final desta análise, os mesmos irão se localizar muito próximos, produzindo a imagem de uma só banda. A mesma discussão pode ser aplicada para os resultados que demonstraram a amplificação de uma banda no gel de agarose, sugerindo a presença de *Streptococcus* spp. (Souza, 2006).

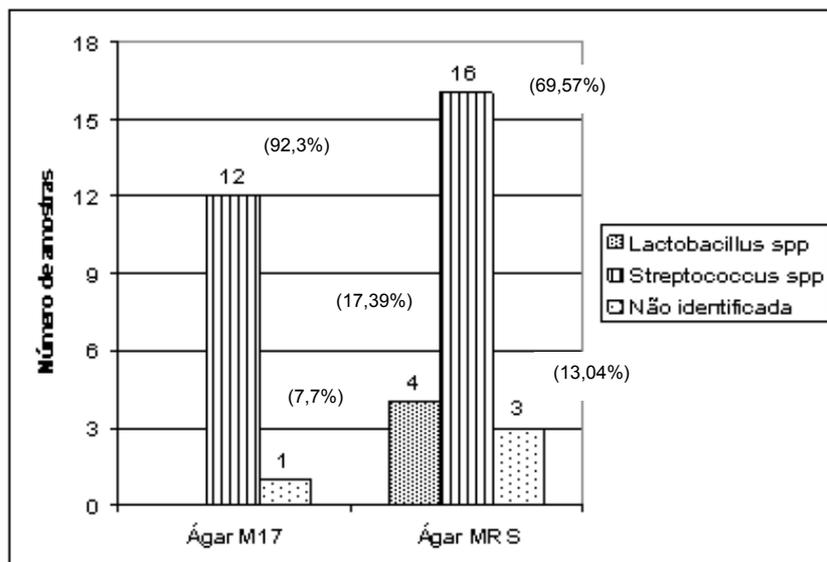


Figura 3- Identificação molecular de bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de bebidas lácteas fermentadas

Os genes 16S e 23S estão presentes mais de uma vez no genoma destas bactérias por codificarem estruturas vitais para os microrganismos: subunidades ribossomais utilizadas para a síntese protéica. Muitas espécies de bactérias apresentam este tipo de múltiplas cópias de genes. Embora as regiões gênicas 16S e 23S sejam muito conservadas, a região entre estes genes é extremamente variável entre os microrganismos de espécies diferentes (Barry *et al.*, 1991).

Foi possível observar que o ágar MRS *Difco* não foi seletivo para propiciar o crescimento preferencial de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Isso pode ser explicado pelo fato de seu pH ($6,5 \pm 0,2$) não ser tão baixo quando comparado ao do ágar MRS *Merck* ($5,7 \pm 0,2$). Portanto, essa condição favoreceu o crescimento de bactérias do gênero *Streptococcus*. De acordo com os dados deste trabalho, foi observado que 69,57% das amostras de bactérias selecionadas para identificação que cresceram em ágar MRS apresentaram uma cópia da região intergênica 16S-23S em seu DNA, o que sugere que as mesmas pertencem ao gênero *Streptococcus*. Em duas das cinco marcas de bebidas lácteas fermentadas analisadas, não foram identificados microrganismos com o perfil de três bandas, típico de bactérias do gênero *Lactobacillus*. No entanto, a coloração pelo método de Gram revelou a presença de bastonetes Gram positivo, que ainda se mostraram catalase negativo, em produtos de todas as marcas avaliadas. Foram observados também cocos Gram positivo e catalase negativo nesses produtos. A

caracterização morfo-tintorial destas bactérias é apresentada no Anexo 6.

Esses resultados indicam que as indústrias processadoras de bebidas lácteas fermentadas estão, provavelmente, utilizando cultura de iogurte, *Streptococcus thermophilus* subespécie *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, para a fermentação desses produtos. Esse achado era esperado, tendo em vista que, muitas vezes, a tecnologia de fabricação dessas bebidas baseia-se na mistura de iogurte e soro lácteo em proporções adequadas, seguida da adição de ingredientes como aromatizantes, corantes, edulcorantes, polpa de frutas e outros, de acordo com a formulação do produtor (Sivieri e Oliveira, 2002). O RTIQ de Bebida Láctea não exige a utilização de um cultivo específico para promover a fermentação de bebidas lácteas fermentadas, apenas define a contagem mínima para os cultivos lácticos empregados durante todo o prazo de validade (Brasil, 2005).

4.2- Detecção de soro lácteo e CMP em leites e bebidas lácteas fermentados utilizando CLAE-FG

Os valores médios de teores de soro lácteo e dos índices de CMP dos leites e bebidas lácteas fermentados em função das concentrações de soro lácteo adicionadas e dos dias de armazenamento em refrigeração a $8-10^{\circ}\text{C}$ são apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. De acordo com os dados contidos na Tabela 10, houve diferença ($p < 0,05$) para as variadas concentrações de soro lácteo das bebidas lácteas fermentadas em um mesmo tempo de armazenamento.

Tabela 10- Resultados médios percentuais dos teores de soro lácteo, obtidos por CLAE-FG, de amostras de leites (0% de soro lácteo) e bebidas lácteas fermentados adicionadas de 10, 20 e 40% de soro lácteo em quatro tempos de armazenamento

Concentração de soro (%)	Dias de Armazenamento			
	0	7	14	21
0	1,66 ^{A d}	1,62 ^{A d}	1,61 ^{A d}	1,63 ^{A d}
10	12,52 ^{A c}	12,40 ^{A c}	13,02 ^{A c}	13,20 ^{A c}
20	25,46 ^{A b}	24,53 ^{A b}	25,27 ^{A b}	25,49 ^{A b}
40	52,09 ^{B a}	51,83 ^{B a}	52,95 ^{B a}	55,63 ^{A a}

Letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$)

Quando as concentrações de soro lácteo são analisadas ao longo do tempo de armazenamento, verifica-se que não há diferença ($p > 0,05$) para as concentrações de 0, 10 e 20% de soro lácteo nos tempos de 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. No entanto, para a concentração de 40% de soro lácteo, foi observada diferença para o tempo de armazenamento de 21 dias ($p < 0,05$), em que o teor de soro obtido foi maior que os demais, que se mostraram equivalentes entre si ($p > 0,05$) para os tempos de 0, 7 e 14 dias.

Os índices médios de CMP obtidos corroboram com esses resultados, apresentando o mesmo comportamento dos teores percentuais de soro (Tabela 11).

Foi observada ainda uma alta correlação entre os resultados de porcentagem de soro e índice de CMP. O coeficiente de correlação entre essas variáveis foi de 99,52%, sendo o mesmo significativo ($p < 0,0001$); desse modo, o índice de CMP acompanha proporcionalmente a porcentagem de soro lácteo. Pode-se estabelecer o seguinte modelo de regressão linear para essas variáveis, com base nos dados obtidos neste trabalho:

$$Y = 15,33408X + 1,39933, \text{ em que:}$$

$$R^2 = 99,05\%$$

Y = índice de CMP, em mg/L

X = porcentagem de soro lácteo;

A Figura 4 apresenta o índice de CMP de leites e bebidas lácteas fermentados de acordo com a porcentagem de soro lácteo.

Tabela 11- Resultados médios do índice de CMP em mg/L, obtidos por CLAE-FG, de amostras de leites (0% de soro lácteo) e bebidas lácteas fermentados adicionadas de 10, 20 e 40% de soro lácteo em quatro tempos de armazenamento

Concentração de soro (%)	Dias de Armazenamento			
	0	7	14	21
0	26,83 ^{A d}	26,30 ^{A d}	25,83 ^{A d}	24,91 ^{A d}
10	194,85 ^{A c}	190,11 ^{A c}	202,62 ^{A c}	205,25 ^{A c}
20	393,54 ^{A b}	379,74 ^{A b}	387,16 ^{A b}	390,92 ^{A b}
40	801,48 ^{B a}	798,98 ^{B a}	810,73 ^{B a}	850,53 ^{A a}

Letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, indicam diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$)

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que é possível utilizar a técnica do índice de CMP, descrita pela IN n°68 para a detecção e quantificação desse composto em leite fluido e leite em pó por CLAE-FG, para bebidas lácteas fermentadas preparadas apenas com leite, soro lácteo e cultura de iogurte, uma vez que não foram verificadas alterações drásticas nos padrões da CLAE e no perfil dos cromatogramas. No entanto, para este produto elaborado com 40% de soro lácteo e armazenado em refrigeração por 21 dias foi observada alteração dos resultados quando comparado com os obtidos nos tempos de armazenamento anteriores. Portanto, bebidas lácteas fermentadas preparadas com este teor de soro lácteo devem ser analisadas por CLAE-FG em até 14 dias de fermentação, de acordo os dados expressos nas Tabelas 10 e 11. Os índices de CMP encontrados para as bebidas lácteas adicionadas de 10, 20 e 40% de soro lácteo com 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento não se adequam às categorias estipuladas pela IN n°69 para leite, sendo bem superiores a 75 mg/L. Apenas o leite fermentado sem adição de soro lácteo (0%), no decorrer de todos os

tempos de fermentação, apresentou índice de CMP de até 30 mg/L, condizente com o preconizado com esta IN para leite.

Os resultados encontrados demonstram que as bactérias *Streptococcus thermophilus* subspécie *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subspécie *bulgaricus*, presentes na cultura YF-L811 utilizada para promover a fermentação das misturas de leite e soro lácteo, não hidrolisaram a κ -caseína entre os aminoácidos 105 e 106, o que produziria um incremento na quantidade de CMP, que seria detectado pela CLAE-FG ao longo dos dias de armazenamento. No entanto, na bebida láctea fermentada elaborada com 40% de soro lácteo e armazenada em refrigeração por 21 dias, foi percebido aumento significativo do percentual de soro lácteo e no índice de CMP detectados por CLAE-FG. Isso pode ter ocorrido em função de uma proteólise não específica da κ -caseína, promovida pelos microrganismos constituintes da cultura, em especial *Lactobacillus*, que são proteolíticos e obtêm aminoácidos a partir da caseína (Martins e Luchese, 1988), o que contribuiu para aumentar a quantidade de CMP na amostra.

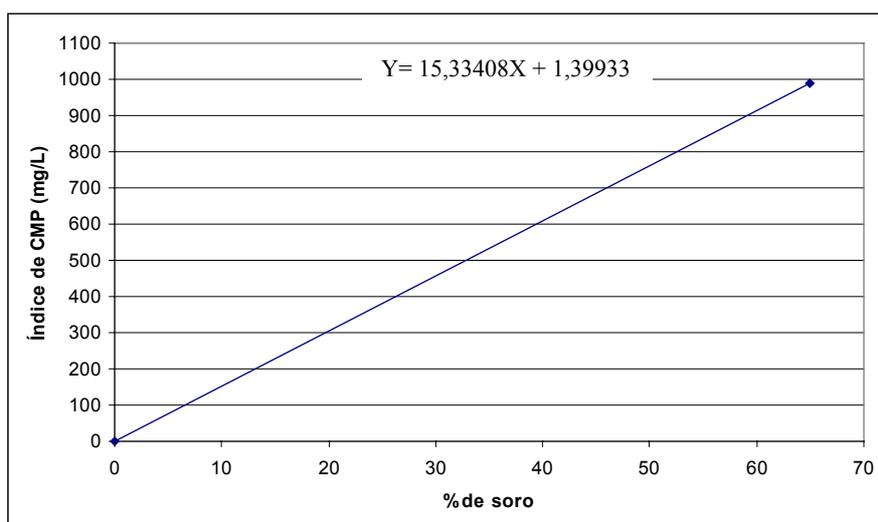


Figura 4- Índice de CMP de bebidas lácteas fermentadas de acordo com a porcentagem de soro lácteo

Esses resultados condizem com os resultados encontrados por Alvim (1992). Este pesquisador inoculou separadamente *Streptococcus thermophilus* subspécie *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subspécie *bulgaricus* em leite desnatado esterilizado. Após a fermentação, esses leites foram estocados a 5°C por 10 e 15 dias, respectivamente. Em seguida, os mesmos foram analisados por CLAE e os resultados obtidos não evidenciaram a presença de CMP. Dessa forma, foi verificado que estas bactérias não produzem enzimas capazes de fragmentar as caseínas do leite em peptídeos de peso molecular semelhante ao do CMP. O mesmo comportamento foi observado para leites inoculados com *Lactococcus lactis* subspécie *lactis* e *Lactococcus lactis* subspécie *cremoris*.

Vilder *et al.* (1988) utilizaram a CLAE na detecção de sólidos de soro lácteo em produtos lácteos ácidos, leite e creme fermentados com culturas iniciadoras empregadas para fabricação de manteiga, por meio da quantificação de CMP. Nesse estudo, foi verificado que a acidificação pode alterar drasticamente todo o padrão da CLAE, mas ainda assim foi possível detectar a presença de soro lácteo em produtos com essa característica. Olieman e van Riel (1989) observaram que a fermentação de leite desnatado por diversos fermentos lácteos empregados na produção de manteiga, em diferentes condições de armazenamento, não forneceram nenhuma indicação de formação de CMP por CLAE-FR. Esses resultados indicam, portanto, que essas culturas iniciadoras usadas para produção de manteiga, não contém enzimas proteolíticas com especificidade semelhante à da quimosina.

Portanto, esses resultados sugerem a possibilidade de se quantificar a porcentagem de soro lácteo e o índice de CMP de bebidas lácteas fermentadas disponíveis no comércio que tenham até 14 dias de fabricação. Desta forma, será

possível obter maiores informações sobre o teor de soro lácteo adicionado ao leite para fabricação desse produto, tendo em vista que a proporção entre esses ingredientes não se encontra fixada do RTIQ de Bebida Láctea.

5- RESUMO DOS RESULTADOS

As bebidas lácteas fermentadas comercializadas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais, pertencentes a cinco marcas distintas, apresentaram qualidade microbiológica satisfatória. Todas as amostras analisadas apresentaram contagens totais de bactérias ácido-lácticas viáveis superiores ao mínimo estabelecido pelo RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) para bebidas lácteas fermentadas durante todo o prazo de validade.

Todas as marcas de bebidas lácteas fermentadas apresentaram teor médio de proteína superior ao mínimo preconizado pelo RTIQ de Bebida Láctea (Brasil, 2005) para bebidas lácteas fermentadas. Os valores médios encontrados para os teores percentuais de gordura e proteína, acidez titulável, pH, sólidos totais e umidade foram condizentes com dados obtidos em trabalhos que também avaliaram estes parâmetros em bebidas lácteas fermentadas.

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os métodos butirométrico para leite fluido e Roesse-Gottlieb (Mojonnier), empregados para a aferição do teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas, indicando que qualquer um deles pode ser utilizado para verificação do teor percentual de gordura deste produto.

Os resultados relativos à identificação de bactérias ácido-lácticas por meio características morfológicas, bioquímicas e por técnicas de Biologia Molecular evidenciaram a presença de bactérias do gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus* em todas as marcas de bebidas lácteas

fermentadas analisadas, sendo que em três delas foi possível identificar a espécie *Lactobacillus delbrueckii*. Esses achados sugerem, provavelmente, a utilização de cultura de iogurte, que contém *Streptococcus thermophilus* subespécie *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, pelas indústrias processadoras para a fermentação desses produtos.

Quando os teores de soro lácteo e os índices de CMP obtidos por CLAE-FG de leites e bebidas lácteas fermentados são analisadas ao longo do tempo de armazenamento, verifica-se que não há diferença ($p > 0,05$) para as concentrações de 0, 10 e 20% de soro lácteo nos tempos de 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. No entanto, para a concentração de 40% de soro lácteo, foi observada diferença significativa para o tempo de fermentação de 21 dias ($p < 0,05$), em que o teor de soro lácteo e o índice de CMP obtidos foram maiores que os demais, que se mostraram equivalentes entre si ($p > 0,05$) para os tempos de 0, 7 e 14 dias. Esses resultados sugerem que as bactérias *Streptococcus thermophilus* subespécie *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, presentes na cultura utilizada para promover a fermentação dos leites e das bebidas lácteas, não hidrolisaram a κ -caseína entre os aminoácidos 105 e 106, o que produziria um incremento na quantidade de CMP, que seria detectado por CLAE-FG ao longo dos dias de armazenamento. No entanto, na bebida láctea fermentada elaborada com de 40% de soro lácteo e armazenada por 21 dias em refrigeração, foi percebido aumento significativo no percentual de soro lácteo e no índice de CMP detectados por CLAE-FG, que pode ter ocorrido em função de uma proteólise não específica da κ -caseína, promovida por esses microrganismos, em especial *Lactobacillus*, que são mais proteolíticos, o que contribuiu para aumentar a quantidade de CMP na amostra.

Foi constatada uma alta correlação entre os resultados de porcentagem de soro lácteo e índice de CMP e foi possível predizer um modelo de regressão linear que associa essas duas variáveis.

6- CONCLUSÕES

Os parâmetros microbiológicos bem como o teor percentual de proteína encontrados para as amostras de bebidas lácteas fermentadas disponíveis em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais, estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação. A cultura utilizada para a fermentação desses produtos é provavelmente de iogurte, que contém *Streptococcus thermophilus* subespécie *salivarius* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*.

O método butirométrico para leite fluido pode ser utilizado, com segurança, para obtenção do teor percentual de gordura de bebidas lácteas fermentadas.

É possível utilizar a técnica do índice de CMP, descrita pela IN n°68 do MAPA, para a detecção e quantificação desse composto por CLAE-FG em leite fluido e leite em pó, para bebidas lácteas fermentadas preparadas apenas com leite, soro lácteo e cultura de iogurte com até 14 dias de armazenamento em refrigeração.

Bebidas lácteas fermentadas disponíveis no comércio, que tenham até 14 dias de fabricação, podem ser avaliadas em relação à quantidade de soro lácteo e ao índice de CMP que apresentam. Desta forma, será possível obter maiores informações sobre o teor de soro lácteo adicionado ao leite para fabricação desse produto.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K. E. de; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.21, n.2, p.187-192, 2001.

ALVIM, T. C. *Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho – filtração gélida*. 1992. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ANDRADE, E. H. P.; BARROS, G. S.; CORREA, G. S. S. et al. Percepção do produto Bebida Láctea pelos consumidores de Belo Horizonte, Minas Gerais. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 16., 2007, Belo Horizonte, MG. *Anais...Belo Horizonte:UFMG*, 2007. CD ROM

ANDRADE, E. H. P.; LEITE, M. O.; SILVA, N. M. A. et al. Índice de CMP de amostras de leite cru analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). In: ENCONTRO NACIONAL E CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...Belo Horizonte:Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos*, 2009. CD ROM

BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; et al. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods and Applications*, v. 1, p. 51-56, 1991.

BRANDÃO, S. C. C.; PARREIRA, J. F. M.; ALVIM, T. C. Detecção da adição de soro de queijo ao leite. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 10., 1988, Juiz de Fora, MG. *Anais... Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG*, 1988. p. 20-21.

BRASIL. Decreto nº 2244 de 04 de junho de 1997. Altera dispositivos do Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, alterado pelos Decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº 1.236, de 2 de setembro de 1994, e nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de junho de 1997, Seção I, p. 11555.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. n. 7 – E, p. 45 – 53. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/form.php?lang=pt>>. Acessado em: 11/09/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acessado em 20/08/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 24 de agosto de 2005. Seção 1, p. 7. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>

consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=12792>. Acessado em
19/08/2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária
e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção
de Produto Animal. Instrução Normativa nº
68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa
os Métodos Analíticos Oficiais Físico-
Químicos, para Controle de Leite e Produtos
Lácteos, em conformidade com o anexo
desta Instrução Normativa, determinando
que sejam utilizados nos Laboratórios
Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial
[da] República Federativa do Brasil*.
Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006.
Seção 1, p. 8. Disponível em:
<[http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=17472](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=17472)>. Acessado em
30/09/2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária
e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção
de Produto Animal. Instrução Normativa nº
69, de 13 de dezembro de 2006. Institui
critério de avaliação da qualidade do leite in
natura, concentrado e em pó, reconstituídos,
com base no método analítico oficial físico-
químico denominado “Índice CMP”, de que
trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de
dezembro de 2006. *Diário Oficial [da]
República Federativa do Brasil*. Brasília,
DF, 15 de dezembro de 2006. Seção 1, p. 67.
Disponível em: <
[http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=17468](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=17468)>. Acessado em
01/10/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária
e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção
de Produto Animal. Instrução Normativa nº
46, de 23 de outubro de 2007. Adota o
Regulamento técnico de Identidade e
Qualidade de Leites Fermentados. *Diário
Oficial [da] República Federativa do Brasil*.
Brasília, DF, 24 de outubro de 2007. Seção
1, p. 5. Disponível em:

<[http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=1816](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
consulta/consultarLegislacao.do?operacao=v
isualizar&id=1816)>. Acessado em
31/03/2009.

CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING,
G. C. *Lactic acid bacteria in beverages and
food*. London: Academic, 1975, 415p.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L.
M.; ALCÂNTARA, L. A. P. et al. Métodos
de detecção de fraude em leite por adição de
soro de queijo. *Revista eletrônica de
Veterinária*. v.8, n.6, p.1-7, 2007.
Disponível em
[http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n
060607/060704.pdf](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n
060607/060704.pdf). Acessado em
03/10/2008.

CHINELATE, G. C. B.; TELLES, F. J. S.;
VIEIRA, J. M. M. et al. Sólidos totais,
viscosidade e teor de proteínas de bebidas
lácteas fermentadas, produzidas no estado
do Ceará. In: CONGRESSO NACIONAL
DE LATICÍNIOS. 22., 2005, Juiz de Fora,
MG. *Anais...* Juiz de Fora: CT/ILCT –
EPAMIG, 2005. p. 147-149.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.;
BONATO, P. S. *Introdução a Métodos
Cromatográficos*. 7 ed. Campinas:Unicamp,
1997. 279p.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.;
BARRETO, P. L. M. et al. Avaliação físico-
química, microbiológica e reológica de
bebida láctea e leite fermentado adicionados
de probióticos. *Semina: Ciências Agrárias*,
v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

DAIRY Handbook Processing. 2 ed. Lund:
Tetra Pak Processing Systems. 2003. 440p.

DALGLEISH, D.G. Analysis by fast protein
liquid chromatography of variants of κ -
casein and their relevance to micellar
structure and renneting. *Journal of Dairy
Research*. v.53, n.1, p.43-51, 1986.

- DRACZ, S. *Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite*. 1996. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- EVANGELISTA, D. T. *Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos*. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>>. Acessado em 25 de novembro de 2009.
- FOX, P. F. *Advanced dairy chemistry: lactose, water, salts and vitamins*. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1997, 536p.
- FUKUDA, S. P. *Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite*. 2003. 149f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. W. Fabricação de queijo prato e minas: estudo do rendimento. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v. 34, n. 204, p. 3-19, 1979.
- GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. *et al.* Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Higiene Alimentar*, v. 7, n. 27, p. 6-11, 1993.
- GUEDES NETO, L. G. *Produção de queijo coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp e bactérias ácido-láticas e de sua atividade antagonista in vitro*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v. 45, n. 4, p. 94-104, 1992.
- HARDING, F. *Milk quality*. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 165 p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk products: Enumeration of coliforms – colony count technique and most probable number technique at 30°C. *IDF Standard 73A*. Brussels: IDF, 1974. 8p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. *IDF Standard 117A*. Brussels: IDF, 1988. 4p.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A.; *Modern Food Microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 790 p.
- KARLSSON, S.; BRANHIDI, Z. G.; ALBERTSSON, A. C. Detection by HPLC of polyamines formed by clostridial putrefaction of caseins. *Journal of Chromatography*. v.442, p.267-277, 1988.
- KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*. v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.
- LASMAR, M. M. *Detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de leite cru conservadas em bronopol*. 2007. 38f. Dissertação (Mestrado

em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LAW, B.A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research*. v.46, n.3, p. 573-588, 1979.

LEE, S. M.; CHEN, J. The influence of extracellular polysaccharide, comprised of calanic acid, on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 during processing and storage of stirred yogurt. *Food Science and Technology*, [S.l.], v. 38, p.785-790, 2005.

LUMLEY, I. D.; PATEL, I.; COHEN, I. C. Evaluation of laboratory-prepared high-performance size-exclusion columns (applications to food analysis). *Journal of Chromatography*. v.408, p.115-127, 1987.

MAFUD, M. D.; ROSSI, R. M.; CAMPOS, E.M. et al. Não-conformidade na cadeia produtiva do leite: problemas institucionais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL. 45., 2007, Londrina, PR. *Anais...Londrina: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, 2007. CD ROM

MARTINS, J. F. P.; LUCHESE, R. H. Determinação da compatibilidade de crescimento associativo entre cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.43, n.256, p.11-13, 1988.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Review: Whey-pollution problem and potencial utilization. *International Journal of Food Science and Technology*, n.23, p.323-336, 1988.

MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F. et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, v. 5, n. 15, p.1-9, 2005.

MORR, C. V.; SEO, A. Fractinat and characterization of glycomacropéptide from caseinate and skim milk hydrolysates. *Journal of Food Science*. v.53, n.1,p.80-87, 1988.

MULVIHILL, D. M.; DONOVAN, M. Whey proteins and their thermal denaturation – a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, v. 11, n.1, p. 43-75, 1987.

NASSIB, T. A.; EL-DIN, M. Z.; EL-SHAROU, W. M. Effect of thermophilic lactic acid bacteria on the viability of *Salmonella* serovar Typhimurium PT8 during milk fermentation and preparation of buffalo's yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, v. 59, n.1, p. 29-34, 2006.

OLIEMAN, C.; VAN DEN BEDEM, J. W. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. v. 37, n. 1, p. 27-36, 1983.

OLIEMAN, C.; VAN RIEL, J. A. M. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk with reversed-phase HPLC. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. v.43, p.171-184, 1989.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

OLIVEIRA, V. M. *Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes*

concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

PFLANZER, S. B.; CRUZ, A. G. da; HATANAKA, C. L. et al. Desenvolvimento do perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 24., 2007, Juiz de Fora, MG. *Anais...* Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG, 2007. p. 91-98.

PIARD, J.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, v. 71, p. 525-541, 1991.

PINTO, A. M.; DIAS, L. F.; OLIVEIRA, A. A. et al. Avaliação microbiológica de bebida láctea fermentada comercializadas na cidade de Viçosa-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS. 13., 2009, Florianópolis, SC. *Anais...* Florianópolis: Colégio Brasileiro de Médicos Veterinários Higienistas de Alimentos, 2009. CD ROM

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Soro de leite: obtenção, características e aproveitamento. *SEMINA: Revista Cultural e Científica da Universidade Estadual de Londrina*, v. 13, n.1, p.92-96, 1992.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M. R.; RAMOS, M. et al. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on κ -casein. *Journal of Dairy Research*. v. 67, n. 4, p.625-630, 2000.

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

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

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Decker, 1993. 442 p.

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

SANTOS, A. K. R. *Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de Staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas*. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SENA, M. J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE*. 2000. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SHARPE, M. E. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *Journal of the Society Dairy Technology*, v.32, n.1, p.9-18, 1979.

SILVA, N. M. A.; LEITE, M. O.; ANDRADE, E. H. P. et al. Avaliação de amostras de leite em pó pela determinação do índice de CMP pelo método CLAE. In: ENCONTRO NACIONAL E CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo

- Horizonte, MG. *Anais...Belo Horizonte:Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos*, 2009. CD ROM
- SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com *fat-replacers* (Litesse e Dairy-lo). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 22, n.1, p.24-31, 2002.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5.ed.São Paulo: Bookman, 2002. 836p.
- SOARES, K. M. P.; SILVA, J. B. A.; AROUCHA, E. M. M. et al. Qualidade microbiológica de bebidas lácteas comercializadas no município de Mossoró-RN. In: ENCONTRO NACIONAL E CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...Belo Horizonte:Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos*, 2009. CD ROM
- SOUZA, M. R. *Identificação molecular e propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de cecos de Gallus gallus domesticus "caipira" e de granja*. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SURIYARACHCHI, V. R.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of yeasts in yogurts. *Applied Environmental Microbiology*, v. 42, n.3, p. 574-579, 1981.
- TANNOCK, G.W.; TISSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. et al. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 4264-4267, 1999.
- TEBALDI, V. M. R.; RESENDE, J. G. O. S.; RAMALHO, G. C. A. et al. Avaliação microbiológica de bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do sul de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*. v.31, n.4, p.1085-1088, 2007.
- TEIXEIRA, L. V. *Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do soro de queijos minas padrão e mussarela produzidos em quatro regiões de Minas Gerais*. 2005. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TEIXEIRA, V. Q.; CORTEZ, M. A. S.; SILVA, C. et al. Comercialização de produtos lácteos com a adição de soro de queijo e avaliação do conhecimento do consumidor em relação à essa adição. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS. 9., 2005, Búzios, RJ. *Anais...Búzios:Colégio Brasileiro de Médicos Veterinários Higienistas de Alimentos*, 2005. CD ROM
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.26, n.3, p.589-595, 2006.
- TISSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, n. 1, p. 49-56, 1997.
- VALENTE, G. F. S.; PINTO NETO, N. I.; SILVA, E. B. da. et al. Avaliação sensorial e aceitação de bebida láctea adicionada de farinha de arroz. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 24., 2007, Juiz de Fora, MG. *Anais... Juiz de*

Fora:CT/ILCT – EPAMIG, 2007. p. 178-181.

VAN HOOYDONK, A. C. M.; OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. v. 36, n. 2, p. 153-158, 1982.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova*, v.25, n.4, p.609-615, 2002.

VERAS, J.F. *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp. isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados*. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VILDER, J.; VAN RENTHERGEN, R.; WAES, G. Determination of rennet whey in sour cream and buttermilk. *Milchwissenschaft*. v.43, n.7, p.426-29, 1988.

VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A. S. *Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento*. Juiz de Fora: Templo Gráfica Editora, 2001. 463p.

VREEMAN, H. J.; VISSER, S.; SLANGEM, C. J.; et al. Characterization of bovine κ -caseina fraction and kinetics of chimosin induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fraction determined by high-performance gel permeation chromatography. *Biochemical Journal*. v. 240, p. 87-97, 1986.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; et al. *Ciencia de la leche y tecnologia de los productos lácteos*. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001, 730 p.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Dairy Chemistry and Physics*. New York: John Wiley and Son. 1984, 467p.

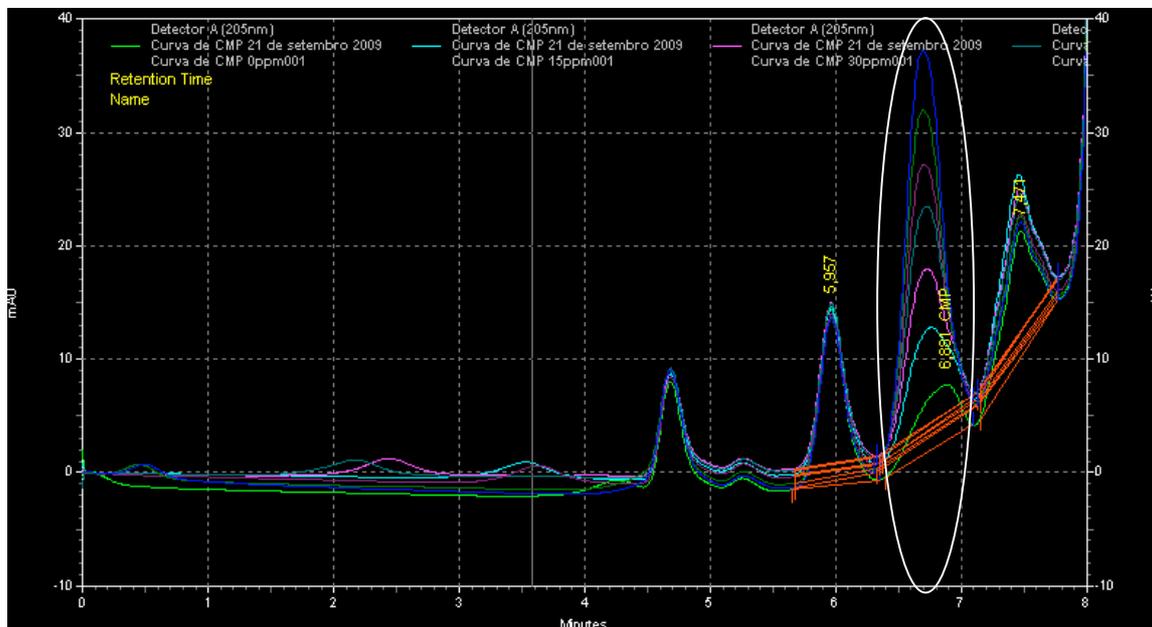
WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Química y física lactológica*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1987, 483p.

8- ANEXOS

Anexo 1- Parâmetros relativos ao soro em pó parcialmente desmineralizado especificados em laudo fornecido pela Alibra Ingredientes Ltda junto ao produto

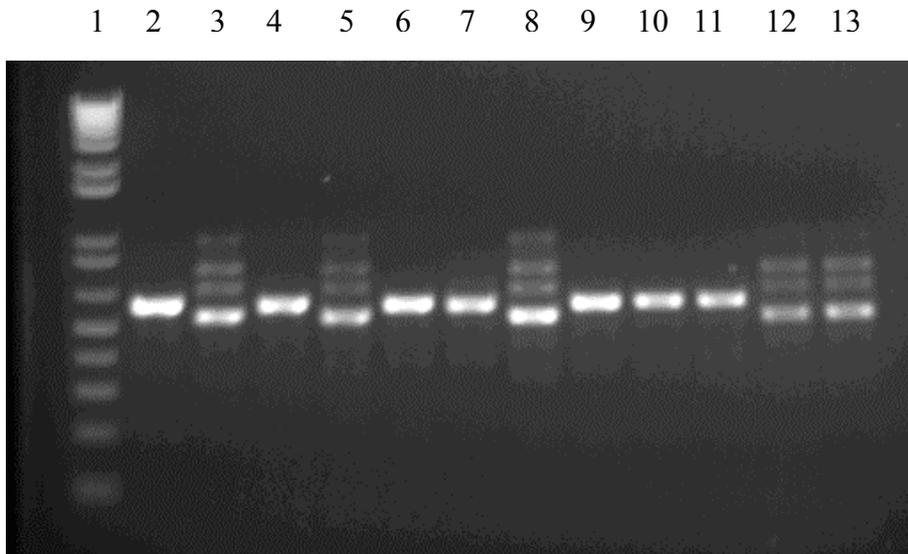
Parâmetros	Especificação	Valores médios	
Lote	-	2323	2324
Data de fabricação	-	03/06/09	03/06/09
Validade	Um ano após fabricação	03/06/10	03/06/10
Aspecto	Pó uniforme, isento de substâncias estranhas	Pó fino, homogêneo	Pó fino, homogêneo
Cor	Branco a amarelado	Branco a amarelado	Branco a amarelado
Sabor/ Aroma	Característicos, isentos de sabor e aromas estranhos	Característicos	Característicos
Umidade (%)	Máximo 3,0	2,70	2,56
Gordura (%)	Máximo 1,0	1,5	1,5
Acidez (% ac. láctico)	Máximo 2,5	1,63	1,45
pH (solução 10%)	6,0 – 7,0	6,31	6,36
Insolubilidade (mL)	Máximo 1,0	0,15	0,05
Teor de cinzas (%)	Máximo 6,0	5,88	5,92
Bolores e leveduras (UFC/g)	Máximo 50	< 10	< 10
Contagem mesófilos (UFC/g)	Máximo 15.000	1000	3200
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Máximo 10	< 10	< 10
Coliformes totais (UFC/g)	Máximo 10	< 10	< 10
Coliformes termotolerantes (UFC/g)	Máximo 10	< 10	< 10

Anexo 3- Sobreposição dos padrões de CMP utilizados para a construção da curva de calibração para o equipamento de CLAE-filtração em gel.



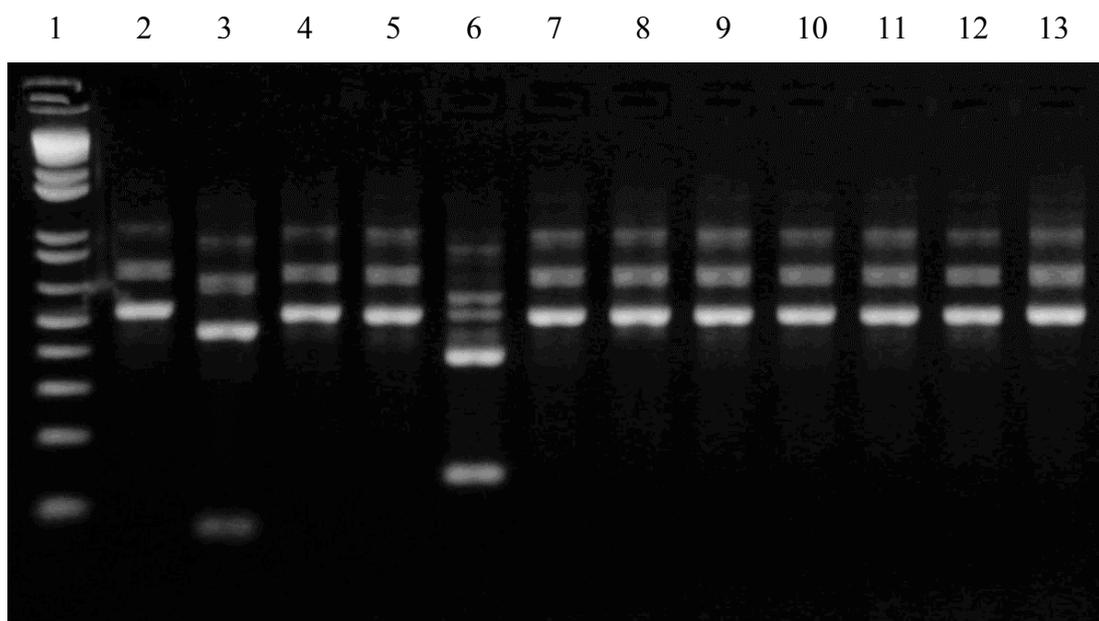
Tempo de retenção do CMP: 6,88 minutos; de baixo para cima: verde claro- amostra branca; azul claro- padrão 15 mg/L de CMP; lilás- padrão 30 mg/L de CMP; azul - padrão 45 mg/L de CMP; roxo- padrão 60 mg/L de CMP; verde escuro- padrão 75 mg/L de CMP; azul escuro- 90 mg/L de CMP;

Anexo 4- Foto do gel de agarose mostrando produtos da PCR- ARDRA 16S-23S rDNA de material genético de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais



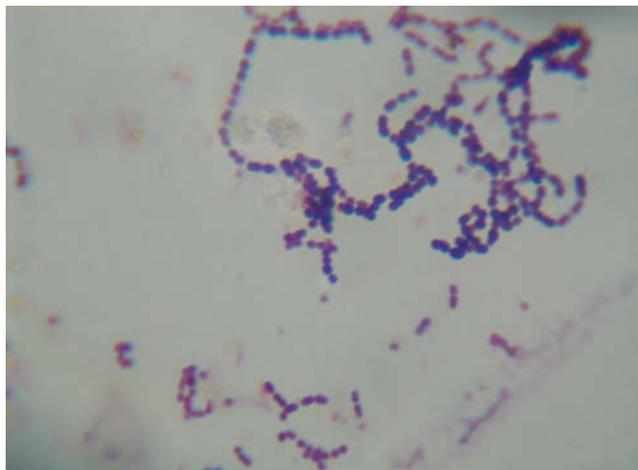
Canaletas da esquerda para a direita: 1.marcador de peso molecular 1 Kb; 2, 4, 6, 7, 9, 10 e 11. amostras que apresentaram uma cópia da região intergênica 16S-23S em seu DNA, o que sugere se tratar de espécies do gênero *Streptococcus*; 3, 5, 8, 12 e 13. amostras que apresentaram três cópias da região intergênica 16S-23S em seu DNA, indicando se tratar de espécies do gênero *Lactobacillus*;

Anexo 5- Foto do gel de agarose mostrando resultado da restrição enzimática de produto PCR-ARDRA 16S-23S rDNA de material genético de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais, identificado como *Lactobacillus delbrueckii*

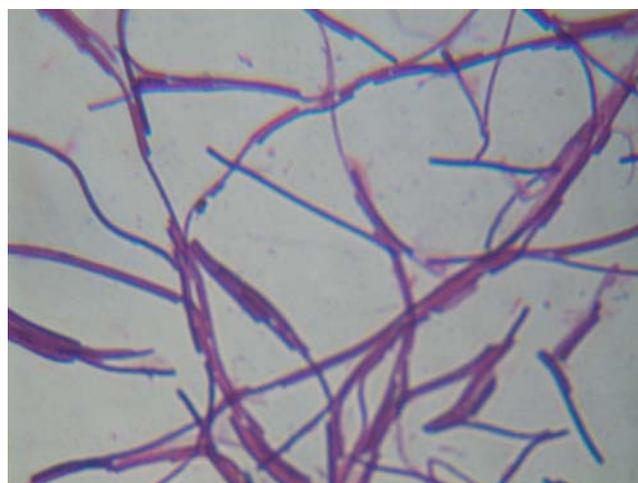


Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de peso molecular 1 Kb; 2. *Sph*I; 3. *Nco*I; 4. *Nhe*I; 5. *Ssp*I; 6. *Sfi*I; 7. *EcoRV*; 8. *Dra*I; 9. *Vsp*I; 10. *Hinc*II; 11. *EcoRI*; 12. *Hind*III; 13. *Avr*II;

Anexo 6- Imagens de fotografias de microscopia direta do aspecto morfo-tintorial de colônias de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de bebidas lácteas fermentadas obtidas em grandes redes de supermercado de Belo Horizonte, Minas Gerais, coradas pelo método de Gram (ampliação microscópica de 100 X).



Cocos Gram positivo



Bastonetes Gram positivo