

ANÁLISE DE RESISTÊNCIA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS À TEMPERATURA AMBIENTE

RESISTANCE ANALYSIS OF LACTIC ACID BACTERIA AT ROOM TEMPERATURE

Caroline Luise Soldi¹
Ester de Almeida Machado Oliveira¹
Willian Barbosa Sales²

RESUMO

Estudo quantitativo com o objetivo de quantificar o crescimento de bactérias lácticas em temperatura ideal (0°C à 10°C), e a 30 e 60 minutos em exposição à temperatura ambiente, em dez marcas de leites fermentados comercializados em um supermercado de Curitiba/Paraná. Foram realizadas diluições seriadas 10⁻³, semeadas em ágar Man Rogosa & Sharpe, e incubadas a 30±1°C por 6 dias. Na sequência, foi realizada Coloração de Gram, Teste de Catalase (-) e a contagem das bactérias lácticas em Unidades Formadoras de Colônia/ml para comparação com a Instrução Normativa nº46/2007, que determina a identidade e qualidade de leites fermentados. As médias do número de colônias para a amostra em temperatura ideal, e em temperatura ambiente por 30 minutos e 60 minutos, foram 3,16x10⁵, 3,64x10⁵ e 2,75x10⁵, respectivamente, não atendendo à Instrução Normativa nº46/2007. No momento da compra, todas as amostras estavam em temperatura adequada, com média de 5,5°C. O teste estatístico de Friedman (p=0,0672) esclarece que não existe diferença significativa entre o número de colônias das amostras em temperatura ideal, por 30 e 60 minutos em temperatura ambiente, embora na análise percentual tenha ocorrido variações.

Descritores: Controle de qualidade; probióticos; *Lactobacillus*.

ABSTRACT

Quantitative study with the objective of quantify the growth of lactic acid bacteria in ideal temperature (0°C to 10°C), 30 and 60 minutes and on display at room temperature, in ten brands of fermented milk sold at a supermarket in Curitiba/Paraná. Were made serial dilutions 10⁻³, sown Man Rogosa and Sharpe agar and incubated at 30±1°C for 6 days, following was performed Gram stain, Catalase test (-) and the count of lactic acid bacteria in Colony-forming Units/ml for comparison with the Normative Instruction nº 46/2007. The average number of colonies to the ideal temperature and sample at room temperature for 30 minutes and 60 minutes were 3,16x10⁵, 3,64x10⁵ and 2,75x10⁵, respectively, not complying with Normative Instruction nº 46/2007. At the time of purchase, all samples were at proper temperature, with an average of 5.5°C. Friedman statistical test (p = 0.0672) clarifies that there is no significant difference between the number of colonies of samples in ideal temperature, for 30 and 60 minutes at room temperature, although the percentage analysis has occurred.

Descriptors: Quality control; probiotics; *Lactobacillus*.

¹ Graduanda do curso de Nutrição do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UNIBRASIL).

² Doutor em Saúde e Meio Ambiente (Univille). Docente do curso de Nutrição do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UNIBRASIL). E-mail: willianbarbosasales@gmail.com. Endereço: Rua Konrad Adenauer, 442, Bloco 2, Tarumã – Cep:82821-020, Curitiba – PR.

INTRODUÇÃO

O consumo de leites fermentados ocorre desde os primórdios da civilização, sendo reconhecidos como uma forma eficaz de promover o aumento da vida de prateleira do leite⁽¹⁾. Com o aumento da demanda da população por alimentos funcionais pela mudança nos seus hábitos alimentares, devido aos avanços da ciência e ao fácil acesso à informação, os consumidores passaram a se preocupar mais com a saúde e a buscar alimentos que promovam uma vida mais saudável e de qualidade, o que impulsionou a expansão de produtos como iogurtes líquidos e outras bebidas lácteas, pela sua conveniência, praticidade, saúde e segurança^(2,3).

Segundo a Instrução Normativa Nº 36/2000,^(4:1) entende-se por bebida láctea o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde “a base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto”.

Conforme a Instrução Normativa Nº 46/2007,^(5:1) define-se leite fermentado como “[...] um produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros lácteos [...]”. Essa mesma legislação ressalta ainda que esse produto é obtido através de fermentação láctea de um ou vários cultivos de “[...] *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* [...]”, em menor escala, *Enterococcus faecium* e/ou outras bactérias ácido lácticas que contribuam para a caracterização do produto final, as quais devem ser viáveis, ativas e abundantes durante todo o prazo de validade do leite fermentado^(5,6,7).

De acordo com o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, define-se alimentos funcionais como aqueles potencialmente saudáveis, incluindo alimentos modificados ou ingredientes alimentares que promovam benefícios à saúde decorrentes dos nutrientes que eles contêm⁽⁸⁾.

A Instrução Normativa Nº 44/2015⁽⁹⁾ caracteriza probióticos como cepas de microrganismos vivos, que agem como auxiliares na recomposição da microbiota do trato digestório dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio. Dentre os principais efeitos dos probióticos estão o tratamento de diarreia, a capacidade para resistir ao suco gástrico, aos sais biliares e às enzimas digestivas gástricas e pancreáticas, a capacidade de aderir à mucosa e conviver com o microbioma intestinal, além de possuir propriedades imunomoduladoras,

produzindo substâncias que inibem o crescimento de bactérias patogênicas, aumentando a imunidade contra esses microrganismos^(10,11,12).

Outra propriedade dos probióticos é o auxílio na prevenção e tratamento de algumas doenças e situações clínicas através da liberação de diversas enzimas e outros compostos no lúmen intestinal. Tais enzimas possuem efeitos sinérgicos na digestão, aliviando sintomas de deficiência na absorção de nutrientes. A produção de ácido butírico e propiônico por algumas bactérias probióticas neutraliza a atividade de alguns carcinógenos presentes na alimentação, como as nitrosaminas, resultantes do metabolismo de bactérias comensais em indivíduos que consomem dietas com alto teor de proteínas^(13,14).

Outro efeito nutricionalmente relevante dos probióticos é na modulação dos níveis sanguíneos de lipídeos, através da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado; porém, é importante salientar que diferentes hipóteses têm sido levantadas nesse contexto e que o mecanismo dos probióticos no controle de colesterol ainda é questionável^(15,16).

Durante toda a sua vida de prateleira, os leites fermentados devem apresentar uma contagem mínima de 10^6 UFC/ ml e a temperatura mínima de comercialização deve ser de 10°C , segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados^(4,17,18). O envase do leite fermentado deve ser feito em materiais adequados que confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação, pois o produto não deverá conter substâncias estranhas ou contaminantes orgânicos ou inorgânicos de qualquer natureza^(4,5). A armazenagem e a exposição à venda desse produto devem obedecer a todas as condições expressas em seu rótulo e todos os envolvidos nos processos de produção, transporte e venda são responsáveis pela qualidade do produto ao ser consumido⁽¹⁹⁾.

Com o leite fermentado em condições adequadas de temperatura e pH, espera-se que suas bactérias lácticas estejam viáveis, podendo, quando administrado em quantidades adequadas - mínimo de 100 gramas diárias por 15 dias consecutivos - promover os efeitos probióticos benéficos à saúde do consumidor^(7,20).

Conforme preconizado pela legislação vigente referente à qualidade dos leites fermentados, e visto que o Brasil vive uma realidade de empresas de alimentos que possuem organização e seriedade para estarem no primeiro mundo e, ao mesmo tempo, enfrenta problemas primários na esfera sanitária, tanto por parte do consumidor, quanto por parte de alguns fabricantes e fornecedores⁽²¹⁾, este trabalho justifica-se pela necessidade de expor a importância da garantia das condições para a sobrevivência das bactérias lácticas até o momento

do consumo, para que estas possam gerar o efeito funcional esperado. O principal objetivo desse estudo foi avaliar o crescimento das bactérias lácticas presentes em amostras de leites fermentados em função do tempo em temperatura ambiente comercializados em um supermercado de Curitiba – Paraná.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo quantitativo de análise microbiológica de dez marcas de leites fermentados que possuíam em suas embalagens a descrição da presença de bactérias lácticas vivas, escolhidos de forma aleatória e dentro do prazo de validade, comercializados em um supermercado de Curitiba – Paraná. A presente pesquisa foi realizada no período de Maio a Julho de 2017.

Como critérios de inclusão foram selecionadas amostras de leites fermentados dentro do prazo de validade que estivessem sendo comercializadas entre 0°C e 10°C, cujas embalagens estavam íntegras. Foram excluídas do estudo amostras de leites fermentados que foram acrescidas de frutas, para estabelecer um padrão na composição das amostras.

No ato da compra foi aferida a temperatura de cada marca de leite fermentado pelo termômetro digital infravermelho B-Max Infrared Thermometer, onde o laser foi direcionado para o centro geométrico da embalagem plástica do produto, podendo o leite fermentado em si apresentar uma variação de temperatura de $\pm 1^\circ\text{C}$ em relação à temperatura da embalagem. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico e transportadas imediatamente ao laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil), para execução das análises.

Para análise microbiológica do leite fermentado, todo o material foi previamente esterilizado e manipulado próximo ao bico de Bunsen com a chama a meia altura. Foram utilizados 25 ml de cada amostra de leite fermentado homogeneizado com 225 ml de água peptonada estéril a 1%, com pH equilibrado, porém, sem o uso de tampão fosfato para evitar injúria às células. Foi realizada a homogeneização das amostras em um liquidificador, devidamente higienizado, para romper as cadeias de bactérias lácticas e resultar em contagens mais acuradas das bactérias presentes. O copo do liquidificador e o diluente foram resfriados a $\pm 10^\circ\text{C}$ antes da homogeneização^(17,18).

Foram realizadas diluições seriadas, compostas de 9 ml de água peptonada e 1 ml de amostra, obtendo diluições $1/10^{-1}$, $1/10^{-2}$ e $1/10^{-3}$ ⁽¹⁷⁾. Foi inoculado 1 ml da diluição 10^{-3} em tempo zero, e posteriormente a 30 e 60 minutos em temperatura ambiente em placas de Petri

estéreis vazias, adicionando, em seguida, o meio de cultura ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS-A). As placas foram incubadas invertidas acondicionadas em jarro com atmosfera anaeróbia a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 dias. Foram selecionadas cinco colônias presentes nas placas e submetidas à coloração de Gram e teste de catalase, para o qual foi colocada na lâmina uma gota de solução salina estéril e semeada uma porção do isolado de cultura, retirado da placa de Petri com a alça bacteriológica, em seguida foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, onde, não havendo bolhas de ar é indicativo de teste negativo⁽¹⁷⁾.

As culturas Gram positivas (cocos ou bastonetes) e catalase negativas foram confirmadas como bactérias lácticas⁽¹⁷⁾. Foi calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em função do número de colônias confirmadas e diluição inoculada. A contagem de colônias de bactérias ácido lácticas das placas foi feita através do cálculo manual pelo contador de colônias. Obteve-se resultados em notação científica multiplicando-se o número de colônias enumeradas pelo inverso da diluição inoculada na placa e recuando a vírgula nas casas decimais para se obter apenas um algarismo inteiro. Todos os resultados foram expressos como Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por ml do produto, para subsequente análise dos resultados quanto à adequação com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de Outubro de 2007, que determina a qualidade de leites fermentados.

Foram calculadas medidas de tendência central (média e desvio padrão) do número de colônias encontradas nas placas de Petri e das temperaturas aferidas do centro geométrico das embalagens plásticas dos leites fermentados no momento da aquisição do produto utilizando Microsoft Excel 2013. Para análise das variações do número de UFC's presentes nas placas de cada amostra em tempo zero, 30 e 60 minutos em temperatura ambiente, foram feitas análises descritivas embasadas nos cálculos de variação percentual, utilizando também Microsoft Excel 2013. Para avaliar a significância do crescimento das bactérias lácticas de acordo com o tempo de exposição do leite fermentado à temperatura ambiente foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Friedman, feito pelo website VassarStats: Statistical Computation.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

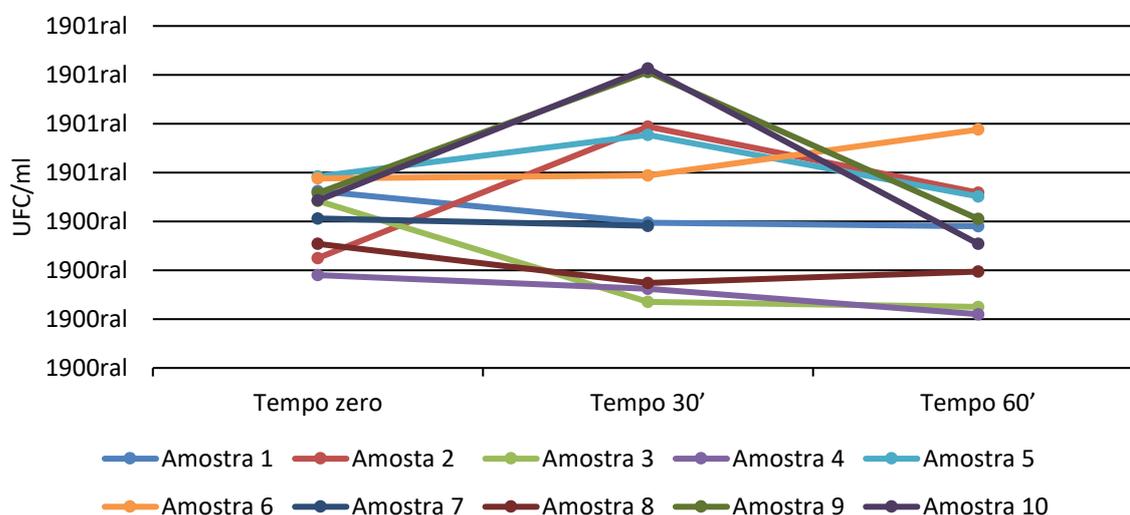
Quanto às temperaturas aferidas no momento da aquisição dos leites fermentados no supermercado, todas estavam entre 0°C e 10°C , sendo a média da temperatura das amostras de $\pm 5,5^{\circ}\text{C}$ (DP 1,58), comprovando que tal supermercado comercializa o produto em temperatura adequada, mesmo levando em consideração que a temperatura do leite fermentado em si pode

apresentar uma variação de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ em relação à temperatura da embalagem, na qual foi feita a aferição com o termômetro e que todas as amostras foram retiradas de apenas um supermercado.

A adequação de temperatura de 100% das amostras encontradas nesse estudo confronta com o resultado de Silva e Ueno⁽²²⁾, que constataram que 13,9% dos equipamentos de refrigeração que acondicionam alimentos em supermercados estavam com temperaturas inadequadas.

Os resultados da submissão das colônias ao teste de catalase com peróxido de hidrogênio 3% e das lâminas à coloração de Gram foram de 100% para catalase negativa e bacilos gram-positivos, sendo positivos para bactérias lácticas. Os dados da contagem de bactérias lácticas foram avaliados de acordo com o número de UFC's encontradas, pela diluição analisada e pelo tempo que a amostra de leite fermentado ficou exposta à temperatura ambiente. Todos os resultados foram tabulados e estão apresentados no Gráfico 1. As médias do número de colônias encontradas por placa de cada amostra em temperatura ideal (entre 0°C e 10°C) foi 316 UFC's (DP 70,19), por 30 minutos em temperatura ambiente foi 364,3 UFC's (DP 179,6) e por 60 minutos em temperatura ambiente foi 275,44 UFC's (DP 120,19).

Gráfico 1 - Número de colônias por placa de cada amostra na diluição de 10^{-3}



Fonte: autoria própria

Pode-se observar que algumas amostras apresentaram comportamentos semelhantes, como as amostras 1, 3, 4 e 7, que apresentaram decréscimo constante do número de bactérias lácticas, mostrando obter microrganismos mais sensíveis ao aumento de temperatura em relação às outras amostras; e como as amostras 2, 5, 9 e 10, que em 30 minutos apresentaram aumento e em 60 minutos apresentaram queda no número de bactérias lácticas, mostrando uma rápida

multiplicação na tentativa de sobreviver a uma temperatura intolerável, o que a curto prazo foi eficiente, porém, aos 60 minutos, essa alta concentração não foi sustentada, ocorrendo grande queda no número de bactérias lácticas.

Os resultados das variações do número de UFC's de cada amostra ao longo do tempo em temperatura ambiente foram obtidos através de cálculos de variação percentual e estão expressos na Tabela 1, na qual observa-se que em 30 minutos de exposição à temperatura ambiente, metade das amostras apresentou aumento e metade apresentou diminuição na concentração de bactérias lácticas. Já em 60 minutos de exposição à temperatura ambiente, a maioria das amostras (80%) teve queda na concentração de bactérias lácticas, o que não foi um valor tão inferior à concentração inicial, exceto na amostra 7, que apresentou uma placa turva e sem formação visível de colônias, sendo considerada como incontável.

Tabela 1 - Variação percentual do número de UFC's ao longo do tempo

	Número da amostra									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Entre zero e 30'	-18,0%	119,6%	-60,5%	-14,7%	21,7%	1,5%	-4,9%	-31,5%	69,3%	78,7%
Entre 30' e 60'	-2,4%	-27,3%	-7,4%	-32,1%	-26,4%	23,9%	-100%*	13,2%	-49,7%	-58,6%

*incomputável (colônias não definidas)

Fonte: autoria própria

O resultado do teste estatístico não paramétrico de Friedman gerou um valor de p de 0,0672, que, quando comparado à significância de 5%, esclarece que não existe diferença significativa entre o número de colônias de bactérias lácticas das amostras em temperatura ideal (entre 0°C e 10°C), em 30 minutos em temperatura ambiente e em 60 minutos em temperatura ambiente, embora na análise percentual das amostras ao longo do tempo tenham ocorrido maiores variações. Os dados meteorológicos indicam que a temperatura média no período de realização das análises microbiológicas, em Curitiba, foi em torno de 14°C e, desta forma, os leites fermentados analisados não foram submetidos a temperaturas elevadas no período em que permaneceram fora da refrigeração, podendo este ser um viés do estudo⁽²³⁾.

Estudos mostram que para ocorrerem alterações significativas no número de bactérias lácticas são necessárias temperaturas mais elevadas e/ou maior tempo de exposição, conforme relatado por Almeida *et al.*⁽²⁴⁾, que mostrou que, a uma temperatura de 3°C e 7°C, a população de células diminuiu entre 16 e 23 dias de armazenamento, e nas condições de 11°C e 15°C, a

redução foi observada com 9 dias de exposição. Resultados semelhantes foram encontrados por Figueiredo *et al.*⁽²⁵⁾, que verificaram números estáveis de cepas lácticas no armazenamento sob refrigeração a 6°C e 8°C ao longo de 14 dias, e estabilidade das cepas armazenadas em temperaturas de 10°C e 12°C somente até o 6º dia, com posterior declínio do número de cepas após esse período.

Entretanto, mesmo a temperatura ambiente tendo influenciado pouco no decréscimo do número de bactérias lácticas, vale ressaltar que as más condições de higiene e a refrigeração inadequada durante o processo de produção e armazenamento estão associadas ao crescimento de microrganismos patogênicos - que representam risco à saúde humana - e/ou microrganismos deteriorantes - que promovem alterações das características organolépticas do produto lácteo – sendo que ambos afetam a segurança alimentar de tal produto⁽²⁶⁾.

Além disso, a exposição à temperatura ambiente a que as amostras foram submetidas neste estudo é proibida pela vigilância sanitária em todos os alimentos que exijam refrigeração constante, nos quais estão inclusos os leites fermentados⁽²⁰⁾. Os testes realizados nesse estudo foram para simular o descuido que pode ocorrer por parte do consumidor ao deixar o produto em temperatura ambiente por muito tempo.

Os resultados da transformação do número de colônias em notação científica foram expressos como Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por ml do produto em potência de 10^5 , como apresentado na Tabela 2, sendo que as médias foram $3,16 \times 10^5$ para a amostra em temperatura ideal, $3,64 \times 10^5$ para a amostra exposta à temperatura ambiente por 30 minutos e $2,75 \times 10^5$ para a amostra exposta à temperatura ambiente por 60 minutos. Desta forma, a quantidade de bactérias lácticas encontradas nas dez marcas de leite fermentado, quando comparada com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, que preconiza que todos os leites fermentados devem apresentar uma contagem mínima de 10^6 UFC/ml, apresentaram-se todas abaixo dessa quantidade mínima, após a transformação em notação científica, conforme evidenciado pelas médias anteriormente citadas.

Tabela 2 - Número de UFC's por ml de leite fermentado em notação científica

Amostra em temperatura (0°C a 10°C)	UFC/mL	Amostra em temperatura ambiente 30'	UFC/mL	Amostra em temperatura ambiente 60'	UFC/mL
1	$3,62 \times 10^5$	1	$2,97 \times 10^5$	1	$2,90 \times 10^5$
2	$2,25 \times 10^5$	2	$4,94 \times 10^5$	2	$3,59 \times 10^5$
3	$3,42 \times 10^5$	3	$1,35 \times 10^5$	3	$1,25 \times 10^5$

4	1,90 x 10 ⁵	4	1,62 x 10 ⁵	4	1,10 x 10 ⁵
5	3,92 x 10 ⁵	5	4,77 x 10 ⁵	5	3,51 x 10 ⁵
6	3,88 x 10 ⁵	6	3,94 x 10 ⁵	6	4,88 x 10 ⁵
7	3,06 x 10 ⁵	7	2,91 x 10 ⁵	7	*
8	2,54 x 10 ⁵	8	1,74 x 10 ⁵	8	1,97 x 10 ⁵
9	3,58 x 10 ⁵	9	6,06 x 10 ⁵	9	3,05 x 10 ⁵
10	3,43 x 10 ⁵	10	6,13 x 10 ⁵	10	2,54 x 10 ⁵

*incomputável (colônias não definidas)

Fonte: autoria própria

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados por Lima *et al.*⁽²⁷⁾, no qual, das dezoito marcas analisadas, apenas seis apresentaram-se dentro dos padrões de contagens estabelecidos pela legislação vigente para bebidas lácteas fermentadas. O estudo de Nunes *et al.*⁽²⁸⁾ diverge dos resultados encontrados em nosso estudo, no qual todas as amostras de iogurte analisadas possuíram um número de unidades formadoras de colônia superior ao preconizado pela legislação de qualidade de iogurtes.

Contudo, mostra-se fundamental a rigorosa fiscalização, monitoramento e ajuste imediato da temperatura dos leites fermentados, desde a produção e manipulação, até o envase, transporte e exposição à venda; bem como a fiscalização das empresas fabricantes de leites fermentados por parte dos órgãos responsáveis quanto ao conteúdo de bactérias lácticas viáveis presentes nos leites fermentados ali produzidos e, caso não esteja de acordo com a legislação vigente, sejam aplicadas sanções à empresa com exigência imediata da regularização da composição do produto.

Tais intervenções devem ocorrer para garantir que o produto que chega até as mãos do consumidor seja livre de qualquer tipo de contaminação e possua bactérias lácticas viáveis em número superior à quantidade preconizada pela legislação, tal como descrito em seu rótulo^[4,5,19]; do contrário, a empresa estará em descumprimento com a RDC N° 259/2002^(29:3), a qual descreve que os alimentos embalados não devem ser descritos ou apresentar rótulo que “ressalte qualidades que possam induzir a engano com relação a [...] propriedades terapêuticas que alguns componentes [...] que tenham ou possam ter quando consumidos em quantidades diferentes daquelas que se encontram no alimento.”

De tal maneira, um leite fermentado que obedeça às condições estabelecidas pelo Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, quando consumido em quantidades adequadas, irá certamente exercer suas propriedades terapêuticas, promovendo benefícios fisiológicos à saúde do consumidor⁽³⁰⁾.

Vale ressaltar que o consumo de alimentos com propriedades probióticas deve ser sempre acompanhado por um profissional nutricionista, que deve recomendar uma introdução gradual destes produtos na alimentação até atingir 100 gramas diárias em um período de 2 a 3 semanas, para evitar um aumento discreto na produção de gases, desconforto abdominal e até mesmo diarreia pela introdução rápida do probiótico. Esses efeitos são leves, não geram complicações e cessam com o tempo^(7,31).

CONCLUSÃO

A análise microbiológica realizada neste trabalho levou a concluir que não existe diferença significativa entre o número de colônias de bactérias lácticas das amostras em temperatura ideal (entre 0°C e 10°C), por 30 minutos em temperatura ambiente e por 60 minutos em temperatura ambiente, embora na análise percentual das amostras ao longo do tempo tenha ocorrido maiores variações, sendo que nenhuma das amostras atendeu à Instrução Normativa nº 46, de 23 de Outubro de 2007, o que reforça a importância da fiscalização do conteúdo de bactérias lácticas viáveis e da temperatura dos leites fermentados para garantir a qualidade do produto. Vale ressaltar que não se deve conservar à temperatura ambiente o leite fermentado e nenhum outro alimento que tenha em sua rotulagem a solicitação de conservação sob refrigeração, pois a temperatura ambiente favorece o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Além disso, a introdução de alimentos com propriedades probióticas na alimentação, como o leite fermentado, deve sempre ser acompanhada por um profissional nutricionista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Tamime AY, Robinson RK. Yoghurt: Science and Technology. 3.ed. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited; 2007.
- [2] Reis DL. Qualidade e inocuidade microbiológica de derivados lácteos fermentados produzidos no Distrito Federal, Brasil [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília - UnB; 2013.
- [3] Thamer KG, Penna, ALB. Caracterização de Bebidas Lácteas Funcionais fermentadas por Probióticos e acrescidas de Prebiótico. Ciênc Tecnol Aliment. 2006; 26(3): 589-95.

- [4] Brasil. Instrução Normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial da União. 2000 out. 31; Seção 1.p 22.
- [5] Brasil. Instrução Normativa nº 46, de 23 de Outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Diário Oficial da União. 2007 out. 23; Seção 1.p 4.
- [6] Garcia RV, Farias LRG, Lima ARC. Estudo de Rótulos de Leite Fermentado Comercializados no Município João Pessoa – PB. Rev Verde. 2012; 7(1): 15-18.
- [7] Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Rev Bras Cienc Farm. 2006; 42(1): 1-16.
- [8] Carvalho JA, Santos CSS, Carvalho MP, Souza IS. O alimento como remédio: considerações sobre o uso dos alimentos funcionais. Rev. Científica do ITPAC. 2013; 6(4): 1-9.
- [9] Brasil. Instrução Normativa nº. 44, de 15 de dezembro de 2015. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União. 2015 dez. 15; Brasília, 2015. Seção 1.p 7.
- [10] Pavan S, Desreumaux P, Mercenier A. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. Clin Diagn Lab Immunol [Internet]. 2003 [acesso em 2017 out 24]; 10(4): 696–701. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164262/>
- [11] Flesch, AGT, Poziomych, AK, Damin, DDC. O uso terapêutico dos simbióticos [revisão]. Porto Alegre: Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas – UFRGS; 2014.
- [12] Villena J, Kitazawa H. Probiotic Microorganisms: A Closer Look. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2017; 5(17): 1-3.
- [13] Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. J Am Diet Assoc [Internet]. 2001 [acesso em 2018 jan 23]; 101(2): 229-38. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11271697>
- [14] Wollowski L, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr [Internet]. 2001 [acesso em 2018 jan 23]; 73(2): 451-55. Disponível em: <http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/451s.full>

- [15] Pereira DIA, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2002; 37(4): 259-81.
- [16] Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal.* 2001; 11: 1-17.
- [17] Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela Editora; 2001.
- [18] Forsythe SJ. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2013.
- [19] Estelles RS. Importância do controle da Temperatura e do Tratamento Térmico na Preservação dos Nutrientes e da Qualidade dos Alimentos [monografia]. Brasília: Universidade de Brasília – UnB; 2003.
- [20] Ballardín AC, Fagundes DI, Guizzo FM, Zucatti KP, Nespolo CR. Análise de microrganismos presentes em amostras de leite fermentado durante a vida de prateleira do produto. In: II Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha, 2014; Caxias do Sul. Rio Grande do Sul: Faculdade da Serra Gaúcha; 2014. P. 388-99.
- [21] Medeiros MCR, Carvalho MGX, Ribeiro MSS, Faustino MVAS, Souza DRM, Araújo VJA. Avaliação Microbiológica e das condições de estocagem da Bebida Láctea Fermentada comercializada no município de Patos no estado da Paraíba. In: VI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande, 2009; Patos. Paraíba: Universidade Federal de Campina Grande; 2009. P. 1-10.
- [22] Silva ABN, Ueno M. Evaluation of lactic acid bacteria viability and titratable acidity variation in fruit flavor yogurt. *Rev Inst Latic Cândido Tostes.* 2013; 68(390): 20-5.
- [23] Inmet. Gráficos de Temperaturas Diárias: Máxima, Média, Mínima. Instituto Nacional de Meteorologia, Brasília [Internet]. 2017 [acesso em 2017 out 24]. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>
- [24] Almeida DM. Determinação do tempo de vida de prateleira de iogurte com de polpa de fruta por meio da população de bactérias lácticas totais. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial.* 2015; 9(1): 1671-81.

- [25] Figueiredo HM, Passos FJV, Moraes CA, Passos FML, Teixeira MA. Produção de leite não-fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 isolado no Brasil. *Braz. J. Food Technol.* 2004; 7(2): 139-44.
- [26] Ribeiro BD, Nascimento RP, Pereira KS, Coelho MAZ. *Microbiologia Industrial: Alimentos*. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2018.
- [27] Lima RMT, Ferraz LPS, Lima RCT, Araújo GT, Paiva JE, Shinohara NKS, et al. Análise microbiológica e físico-química de bebidas lácteas comercializadas no Recife – PE. In: *Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 2009; Recife. Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2009. P. 1-3.*
- [28] Nunes CRZ, Silva ML, Bortoluzzi M. Análise Microbiológica e Físico-sensorial de Iogurtes sabor Ameixa comercializados na região oeste do Paraná [trabalho de conclusão de curso]. Medianeira: Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR; 2013.
- [29] Brasil. RDC nº 259, de 20 de Setembro de 2002. Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. *Diário Oficial da União*. 2002 set. 23; Seção 1.p 3.
- [30] Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2002 [acesso em 2018 jan 11]; 34(2): 105-10. Disponível em: [https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658\(02\)80176-1/pdf](https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658(02)80176-1/pdf)
- [31] Raizel R, Santini E, Kopper AM, Filho ADR. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Rev Ciência e Saúde*. 2011; 4(2): 66-74.

Recebido em 02/11/2018
Aprovado em 17/08/2019
Received in 11/02/2018
Approved in 08/17/2019