



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRENNALVES COSTA

**INFLUÊNCIA DA TÉCNICA DE SEMEADURA E DA ATMOSFERA DE
INCUBAÇÃO NAS CONTAGENS DE LACTOBACILOS EM IOGURTES NATURAIS**

João Pessoa-PB
2021

BRENNALVES COSTA

**INFLUÊNCIA DA TÉCNICA DE SEMEADURA E DA ATMOSFERA DE
INCUBAÇÃO NAS CONTAGENS DE LACTOBACILOS EM IOGURTES NATURAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Professora Dr.^a Janeeyre Ferreira Maciel

João Pessoa-PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838i Costa, Brenna Alves.

Influência da técnica de semeadura e da atmosfera de
incubação nas contagens de lactobacilos em iogurtes
naturais / Brenna Alves Costa. - João Pessoa, 2021.
31 f. : il.

Orientação: Janeeyre Ferreira Maciel.
TCC (Graduação) - UFPB/CT/DEA.

1. Leite fermentado. 2. Bactérias lácticas. 3.
Viabilidade. I. Maciel, Janeeyre Ferreira. II. Título.

UFPB/BSCT

CDU 664 (043.2)

BRENNA ALVES COSTA

**INFLUÊNCIA DA TÉCNICA DE SEMEADURA E DA ATMOSFERA DE
INCUBAÇÃO NAS CONTAGENS DE LACTOBACILOS EM IOGURTES NATURAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso que apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Resultado: Aprovada
Nota: 10,0
Aprovado em: 16/07/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Janeeyre Ferreira Maciel

DEA/CT/UFPB



Prof^a. Dr^a. Mabel de Barros Batista

DEA/CT/UFPB



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Muniz

DEA/CT/UFPB

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar durante todo o período de graduação, e por cada dia que esteve ao meu lado me dando força, saúde e sabedoria.

Aos meus pais, Guia Alves e Pedro Costa, por serem meus maiores incentivadores e alicerce. Sou grata a vocês por todo o esforço diário feito para me proporcionar essa oportunidade, pelos ensinamentos, educação, compreensão e por conseguirem se fazer presente até nas minhas noites de estudo. Eu devo tudo que sou a vocês.

Ao meu irmão, Dean Costa, pela parceria, apoio e por me impulsionar tanto na vida profissional quanto pessoal.

Aos demais familiares por contribuírem com a minha formação pessoal de forma significativa, cuidando de mim com tanto amor, carinho e dedicação.

A todos os meus amigos de graduação que compartilharam diversos momentos durante esses anos, em especial a Viviane Fontes, Taina Pinheiro, Taynar Nobre, Michael Xavier, Rhennan Marques, Mariana Fonseca e Ítalo Carvalho. Obrigada por todos os momentos de descontração, pela convivência do dia a dia, pela ajuda nas dificuldades, pelas conversas edificantes e pela amizade.

A ENGAJA – Empresa Junior de Engenharia de Alimentos por toda a experiência/desafios que me foi proporcionado e pelos amigos que fiz.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a. Janeeyre Maciel pela orientação, disponibilidade e confiança em mim durante todos esses anos a qual me acolheu e incentivou em diversos projetos acadêmicos.

A todos amigos, professores, técnicos de laboratório que estiveram comigo durante toda essa jornada e que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação acadêmica.

RESUMO

Os iogurtes naturais são obtidos a partir da fermentação do leite, por ação de duas bactérias lácticas adicionadas como culturas starters: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. O consumo desses microrganismos em iogurtes pode conferir benefícios a saúde, desde que sejam ingeridos em quantidades adequadas (mínimo: 10^7 UFC/g). Devido a essa exigência, são inúmeras as pesquisas de monitoramento da viabilidade de bactérias lácticas durante a estocagem refrigerada dos iogurtes. Apesar de haver metodologia padronizada, para a realização das contagens desses microrganismos, são muitos os estudos que adotam variações nesse método, incluindo mudanças nas condições de atmosfera de incubação e técnica de semeadura. Sendo assim, o objetivo foi verificar se há diferença entre as contagens de lactobacilos em iogurte natural nas diferentes técnicas de semeadura e atmosfera de incubação. Para isso, foi realizada a contagem de *L. bulgaricus* utilizando o ágar MRS variando a técnica de semeadura (superfície, profundidade e profundidade com cobertura) e a atmosfera de incubação (aeróbica e microaerófila). Além disso, também foi verificado o pH e acidez das amostras. Com base nos resultados, as marcas analisadas atenderam as exigências da legislação quanto aos limites de acidez, tendo variado de 1,03 a 1,35%. O pH oscilou entre 3,76 a 4,45, estando dentro dos limites recomendados na literatura. No que diz as contagens, os resultados variaram de 5 a 8 log UFC/g nas diferentes técnicas de semeadura e de 6 a 8 log UFC/g nas duas atmosferas de incubação. Portanto, foi possível concluir que quanto menor a exposição ao oxigênio, tem-se uma melhor recuperação de lactobacilos, evidenciado nas contagens ou no tamanho das colônias. Ademais, a incubação aplicando a técnica de semeadura em profundidade em aerobiose mostrou-se eficaz, visto que não apresentou diferença significativa quando comparado com a microaerofilia.

Palavras-chave: leite fermentado; bactérias lácticas; viabilidade.

ABSTRACT

Natural yogurts are obtained from the fermentation of milk by the action of two lactic bacteria added as starter cultures: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. The consumption of these microorganisms in yogurts can confer health benefits, provided they are ingested in adequate quantities (minimum: 10^7 CFU/g). Due to this requirement, there are numerous researches on monitoring the viability of lactic bacteria during the refrigerated storage of yogurts. Although there is a standardized methodology to perform counts of these microorganisms, there are many studies that adopt variations in this method, including changes in incubation atmosphere conditions and seeding technique. Thus, the objective was to verify if there is a difference between the counts of lactobacilli in natural yogurt in different seeding techniques and incubation atmosphere. For this, the count of *L. bulgaricus* was performed using the MRS agar by varying the seeding technique (surface, depth and depth with coverage) and the incubation atmosphere (aerobic and microaerophilic). In addition, the pH and acidity of the samples were also checked. Based on the results, the analyzed brands met the requirements of the legislation regarding the acidity limits, ranging from 1.03 to 1.35%. The pH ranged from 3.76 to 4.45, being within the limits recommended in the literature. As for the counts, the results ranged from 5 to 8 log CFU/g in the different seeding techniques and from 6 to 8 log CFU/g in the two incubation atmospheres. Therefore, it was possible to conclude that the lower the oxygen exposure, the better the recovery of lactobacilli, evidenced in the counts or the size of the colonies. Furthermore, the incubation applying the deep seeding technique in aerobiosis proved to be effective, since it did not show significant difference when compared to microaerobiosis.

Keywords: fermented milk; lactic bacteria; viability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	logurtes: Conceitos e tipos	12
3.2	Bactérias lácticas do iogurte	12
3.3	Fatores que afetam a viabilidade das bactérias lácticas nos iogurtes	14
3.4	Condições de atmosfera de incubação adotadas nas contagens de <i>L. bulgaricus</i> em iogurtes	14
4	METODOLOGIA	17
4.1	Caracterização da pesquisa	17
4.2	Local de realização da pesquisa	17
4.3	Coleta de Amostras	17
4.4	Planejamento experimental	17
4.5	Material e métodos	18
4.5.1	Determinação de pH e acidez	18
4.5.2	Contagem seletiva de <i>L. bulgaricus</i>	18
4.6	Análise dos resultados	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1	pH e acidez	20
5.2	Contagens de Lactobacilos utilizando diferentes técnicas de semeadura	21
5.3	Contagens de lactobacilos em diferentes atmosferas de incubação	24
6	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O iogurte natural padrão é um leite fermentado elaborado exclusivamente com ingredientes lácteos, obtido por ação simbiótica das bactérias lácticas *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ambas classificadas como bactérias termofílicas, por crescerem em temperatura $\geq 40^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2007; GUIMARÃES, 2011).

Essas bactérias lácticas, quando consumidas juntas aos iogurtes, em quantidades adequadas ($\geq 10^8$ UFC/g) podem exercer efeito benéfico a saúde humana (URIOT et al., 2017). Para assegurar que esse benefício seja alcançado, muitos estudos de monitoramento da viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes têm sido conduzidos em todo o mundo.

Entretanto, apesar de existir metodologia padronizada para contagem seletiva de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em iogurtes (*International Organization for Standardization-ISO*, 2003), variações desse método são observadas, especialmente na contagem de *L. bulgaricus*, incluindo mudanças nas técnicas de semeadura e nas condições de atmosfera de incubação (DUALDO et al., 2010; PEREIRA, 2012; SILVA, 2010).

Considerando que os resultados dessa contagem são utilizados para atestar que iogurtes comerciais apresentam as quantidades mínimas exigidas de bactérias lácticas, é de suma importância que os métodos selecionados para fazer essas investigações sejam confiáveis.

Diante do exposto, pretende-se confirmar a seguinte hipótese: se alterar a técnica de semeadura e a atmosfera de incubação na contagem seletiva de *L. bulgaricus* em iogurtes, os resultados dessa contagem serão alterados de forma significativa.

Nesta pesquisa, o objetivo foi avaliar a influência da técnica de semeadura e das condições de atmosfera de incubação nas contagens de lactobacilos em iogurtes naturais comerciais.

Considera-se que a realização do trabalho é bastante oportuna, pois servirá como base para estudos posteriores e compartilhamento na comunidade acadêmica, uma vez que irá identificar as melhores condições de incubação e semeadura para recuperar as bactérias lácticas do iogurte. Ademais, tem potencial para fortalecer o

vínculo entre a universidade e as empresas produtoras, visto que esse controle microbiológico poderá diagnosticar possíveis falhas na elaboração desse produto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da técnica de semeadura e das condições de atmosfera de incubação nas contagens de lactobacilos em iogurtes naturais comerciais.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o pH e acidez das amostras;
- Testar diferentes técnicas de semeadura na contagem seletiva de *L. bulgaricus*;
- Testar diferentes atmosferas de incubação para contagem seletiva de *L. bulgaricus*;
- Comparar os tratamentos testados, utilizando análise estatística.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Iogurtes: Conceitos e tipos

Em alguns países, o iogurte pode ser classificado em dois tipos diferentes: iogurte padrão, obtido a partir de cultura mista constituída por *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e bio-iogurte, quando é adicionado de linhagens probióticas de bactérias lácticas, especialmente *L. acidophilus* e de bifidobactérias. Segundo a legislação brasileira, a denominação “iogurte” somente poderá ser utilizada quando o produto for obtido a partir da cultura mista de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, podendo esse ser adicionado de outras bactérias lácticas e bifidobactérias, sendo mantida a mesma denominação (BRASIL, 2007).

No Brasil, existem diversos tipos de iogurtes, que diferem quanto ao sabor, composição, consistência e valor calórico (light/diet).

De acordo com o teor de gordura, os iogurtes podem ser classificados nos seguintes tipos: com creme (mínimo 6%), integral (mínimo 3%), parcialmente desnatado (máximo 2,9%) e desnatado (máximo de 0,5 %) (BRASIL, 2007).

Com relação aos ingredientes adicionados à formulação, os iogurtes podem ser denominados como naturais, quando são adicionados exclusivamente de ingredientes lácteos. Caso sejam adicionados açúcar, aroma e/ou sabor, a designação deverá ser modificada, incluindo essas informações, especificando-se o aroma/sabor utilizado (BRASIL, 2007).

3.2 Bactérias lácticas do iogurte

Bactérias lácticas são microrganismos Gram-positivos, em forma de bacilos ou cocos, não esporulados, aeróbios facultativos ou anaeróbios, catalase-negativos, que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (HAYEK E IBRAHIM, 2013).

Algumas bactérias lácticas são designadas como probióticas, pois quando ingeridas viáveis e em quantidades adequadas exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002), devendo estas também apresentarem boa sobrevivência e capacidade de multiplicação no trato intestinal, características não apresentadas por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, sendo esta a razão da exclusão

dessas duas bactérias lácticas como probióticas (KLEIN *et al.*, 1998). De acordo com a EFSA - Agência Europeia de Segurança Alimentar, essa quantidade é 10^8 UFC/g (URIOT *et al.*, 2017), enquanto o Brasil (2007) considera um valor mínimo de 10^7 UFC/g. Já a Agência Canadense de Inspeção dos Alimentos - CFIA (2009) recomenda que uma ingestão maior que 10^9 UFC/g. Segundo Kumar e Kumar (2016) esse valor deve ficar entre 10^6 e 10^7 UFC/g.

As bactérias da espécie *S. thermophilus* são Gram-positivas, na forma de cocos, anaeróbias facultativas (com capacidade de propagação na presença de oxigênio) e homofermentativas, com produção predominante de ácido láctico e, em quantidades menores, diacetil, acetaldeído, ácido pirúvico e ácido fórmico, a partir da lactose. Essa é a única espécie do gênero usada como inóculo na produção de iogurte. A temperatura de crescimento ótimo desta bactéria láctica está situada entre 35 a 42 °C (ARAÚJO, 2015).

As bactérias da espécie *L. bulgaricus* são Gram-positivas, em forma de bacilos, catalase negativas, anaeróbias facultativas, não-esporuladas, imóveis e homofermentativas, produzindo principalmente como produto da fermentação o ácido láctico, e, como produto secundário, o acetaldeído. O crescimento ótimo deste microrganismo está na faixa de temperatura entre 43 a 46 °C (ARAÚJO, 2015).

Existe uma relação simbiótica entre *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, durante a elaboração do iogurte. No início da fermentação, a acidez do leite favorece o crescimento dos *S. thermophilus*, que é estimulado por alguns peptídeos e aminoácidos essenciais livres produzidos pelo *L. bulgaricus*. O *S. thermophilus*, em contrapartida, produz ácido fórmico, ácido láctico e dióxido de carbono, diminuindo o pH do meio e proporcionando condições microaeróbias, estimulando, assim, o crescimento do *L. bulgaricus* (HORIUSHI E SASAKI, 2012; TAMIME, 2006). Ocorre a inibição do *S. thermophilus* quando o pH atinge valores entre 4,2 - 4,4, enquanto que *L. bulgaricus* tolera valores de pH de até 3,5. Após a fermentação, *L. bulgaricus* continua a reduzir o pH devido à produção de quantidades excessivas de ácido láctico. O pH do iogurte comercial é geralmente no intervalo de 3,7 - 4,6 (VIDAL; NETTO, 2018; SANTOS *et al.*, 2020).

3.3 Fatores que afetam a viabilidade das bactérias lácticas nos iogurtes

A sobrevivência das bactérias lácticas no iogurte é fundamental para que sejam alcançados os benefícios previstos a saúde do consumidor, sendo necessária a manutenção de populações suficientemente elevadas desse grupo de microrganismos (tipicamente acima de 10^7 UFC/ml ou g).

Diversos fatores podem afetar a viabilidade das bactérias lácticas em iogurtes: a composição das formulações, a acidez, presença de peróxido de hidrogênio e de oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação, condições de fermentação e estocagem (especialmente temperatura e tempo), fatores de crescimento e inibidores, entre outros (SHAH, 2007).

Dentre esses fatores, a acidez do produto final é considerada como a principal causa da redução no número de bactérias lácticas durante a estocagem (SHAH, 2007). Entretanto, a influência desse fator é fortemente determinada pelo tipo de bactéria láctica adicionada ao produto.

Outro fator pouco investigado em iogurtes comerciais e que merece destaque é a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no produto. Esse gás pode ser incorporado durante o processo de fabricação, especialmente durante a etapa de quebra do gel por meio de agitação, mas também pode ser proveniente da migração de oxigênio do ambiente externo para o interior da embalagem, durante toda a sua vida útil, sob condições de estocagem refrigerada, nos pontos de venda. O *L. bulgaricus* está entre as bactérias lácticas menos tolerante ao oxigênio. Com relação a tolerância e utilização de oxigênio, as diferenças geralmente observadas entre as linhagens se devem a variabilidade em seus sistemas enzimáticos (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004).

3.4 Condições de atmosfera de incubação adotadas nas contagens de *L. bulgaricus* em iogurtes

A maioria das pesquisas sobre contagens de *L. bulgaricus* utilizam o ágar MRS como meio de cultura, mas as condições de atmosfera de incubação têm sido conduzidas de forma muito variável, o que dificulta a comparação entre resultados obtidos nos diferentes estudos.

Para fins de padronização, alguns órgãos renomados como a Federação Internacional de Laticínios-FIL e a Organização Internacional de padronização –ISO têm elaborado métodos padrões para contagem de bactérias lácticas em iogurtes. De acordo com o método ISO 7889:2003 (ISO, 2003), a contagem de *L. bulgaricus* deve ser feita utilizando a técnica de sementeira em profundidade, em ágar MRS, com incubação a 37 °C, durante 72 horas, sob condições microaerofílicas. Esse método não especifica concentrações mínimas e máximas para oxigênio e dióxido de carbono, nos sistemas comerciais adquiridos para esse fim.

Dentre os sistemas comerciais mais utilizados nas contagens de *L. bulgaricus* destacam-se: Anaerocult C (Merck), com 5-7% de oxigênio e 8-10% CO₂; *Gaspack anaerobic system* (Oxoid), com <1% de oxigênio e 4-10% CO₂; *Anaeropack system* (Mitsubich), com <1% de oxigênio e 18% CO₂; BD *Gaspack EZ campy container system*, com 6-16% de oxigênio e 2-10% CO₂ e BD *Gaspack EZ anaerobe container system*, com <1% de oxigênio e 13% ou mais de CO₂.

Além das variações nas concentrações dos gases oxigênio e dióxido de carbono, esses sistemas variam no tempo de formação desses gases no interior das jarras de anaerobiose. Entretanto, os efeitos dessas variações sobre as contagens de lactobacilos têm sido pouco investigados.

Segundo Cruz *et al.* (2013) o *L. bulgaricus* apresentou menor contagem viável em comparação com o *S. thermophilus*, mesmo não sendo uma diferença significativa, quando a concentração de OD era de 7,0 mg/kg.

Horiuchi e Sasaki (2012) também demonstraram que o oxigênio dissolvido (OD) interfere na relação simbiótica entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Esses autores verificaram que a produção de ácido por essas culturas era bastante acelerada quando o OD da mistura do iogurte foi reduzido para quase 0 mg/kg, mas reduzida quando alcançava 1 mg/kg e quase totalmente suspensa com mais de 2 mg/kg na mistura.

Cruz (2010) encontrou, em amostras de iogurte elaborado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, concentração de OD de 5,94 mg/kg, após 15 dias de estocagem refrigerada a 5 °C, indicando elevadas concentrações de oxigênio nesse produto, o que contribui para a redução na viabilidade das bactérias lácticas, especialmente dos lactobacilos. Entretanto, Domingos (2010) obteve valores variando de 1,2-1,7 mg/kg de OD em amostras de iogurte adicionado de luteína, após 35 dias de estocagem

refrigerada. Esses dois tipos de iogurtes foram produzidos em laboratório, não sendo encontrados relatos sobre concentrações de OD em iogurtes comerciais.

Concentrações baixas de oxigênio de 10-20% aumenta o crescimento e acidificação das culturas, o que por sua vez, encurta o tempo de fermentação necessário para a coagulação das proteínas do leite, que ocorre quando o pH se situa em torno de 4,5 (HORIUCHI; SASAKI, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização da pesquisa

O projeto trata de um estudo explicativo e quantitativo, com a aplicação de pesquisa experimental em laboratórios.

4.2 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi obtida de forma híbrida, respeitando todas as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e os decretos estaduais e municipais decorrentes da pandemia COVID-19, com a realização de análises no Laboratório de Microbiologia de Alimentos situado no Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, e uma pesquisa bibliográfica/documental e tratamento dos dados realizado de forma remota.

4.3 Coleta de Amostras

Amostras de duas marcas de iogurtes naturais comerciais, acondicionados em potes plásticos com peso líquido expresso de 170 g, foram adquiridas, mediante compra, em supermercados de João Pessoa-PB, no período de fevereiro à maio de 2021. Estudo preliminar identificou as marcas com maior crescimento de Lactobacilos, as quais foram utilizadas nessa pesquisa (BARROS *et al*, 2019).

No momento da coleta, foram observadas algumas condições das amostras, tais como: integridade das embalagens, prazo de validade, entre outros. Foram coletadas 5 unidades de amostras, por marca, de diferentes lotes, sendo os produtos transportados até o laboratório em caixas isotérmicas, contendo gelo.

No laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises de pH, acidez e contagem seletiva de *Lactobacillus bulgaricus*.

4.4 Planejamento experimental

Os testes foram realizados tendo em vista a corroboração da seguinte hipótese: se alterasse a técnica de sementeira e as condições de atmosfera de incubação, então

a contagem seletiva de *L. bulgaricus* em iogurtes foi alterada de forma significativa. Desta forma são definidas as seguintes variáveis:

- Variáveis independentes: técnica de semeadura e atmosfera de incubação;
- Variável dependente: contagem de *L. bulgaricus*.

Para a variável técnica de semeadura foram realizados três tratamentos, assim definidos: semeadura em profundidade (PP), semeadura em profundidade com sobrecamada (PPC) e semeadura em superfície (SP), para verificar sua influência na contagem. Para a variável atmosfera de incubação foram realizados dois tratamentos, incubação aeróbica e incubação microaerófila.

4.5 Material e métodos

4.5.1 Determinação de pH e acidez

O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente em cerca de 50 mL da amostra homogeneizada em um béquer de 100 mL. A acidez foi obtida por titulação de alíquotas de 10 g de amostras de iogurte homogeneizadas em 10 mL de água destilada, com solução de hidróxido de sódio N/9, em presença do indicador fenolftaleína, sendo os resultados expressos em g de ácido láctico/100 g (BRASIL, 2006).

4.5.2 Contagem seletiva de *L. bulgaricus*

Inicialmente, foi realizada a higienização e a homogeneização das amostras na própria embalagem, invertendo-a de 5 a 10 vezes. Após abertura das embalagens, foi pesada 25 g de amostra, que foi transferida para frascos contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada, formando a diluição 10^{-1} . Após homogeneização desta primeira diluição, alíquota de 1 ml foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 ml de diluente obtendo assim a diluição 10^{-2} . Esse procedimento foi repetido até a obtenção da diluição 10^{-7} .

Para a contagem seletiva de *L. bulgaricus* foi utilizado o ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) utilizando-se as técnicas de semeadura em profundidade,

semeadura em profundidade com sobrecamada de cobertura e semeadura em superfície.

A partir das diluições, alíquotas de 1 mL de amostra foram semeadas em placas de Petri vazias, previamente esterilizadas, e em seguida foi adicionado cerca de 15 mL de ágar MRS, previamente aquecido e mantido em banho-maria a 45 °C. A homogeneização das placas foi feita delicadamente com movimentos em forma de oito, deixando-as em repouso por 15 minutos para a solidificação do meio, essa é a técnica de semeadura em profundidade. Para a técnica de semeadura em profundidade com sobrecamada de cobertura esses mesmo passos são seguidos e em seguida, coloca uma camada de cobertura contendo 5-7 mL de ágar MRS. As placas foram mantidas com a tampa para cima por 15 minutos e após esse tempo, foram invertidas e encaminhadas para incubação.

Na técnica de semeadura em superfície foram utilizadas as diluições de 10^{-2} a 10^{-7} , a partir delas, alíquotas de 0,1 mL de amostra foram semeadas em placas de Petri contendo o ágar MRS, e espalhou uniformemente com a alça de Drigalsky. As placas foram mantidas com a tampa para cima por 15 minutos e após esse tempo, foram invertidas encaminhadas para incubação.

Com relação as condições de atmosfera de incubação foram utilizadas a incubação aeróbica e em jarra de anaerobiose, contendo sachê gerador de microaerofilia. Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48-72 horas. Após incubação, as placas com 25-250 colônias foram contadas, utilizando um contador de colônias, e os resultados foram expressos em UFC/g. Foram selecionadas em torno de 5 colônias e submetidas à coloração de Gram e teste de Catalase para confirmação do grupo avaliado (APHA, 2001).

4.6 Análise dos resultados

Os resultados das análises de pH, acidez e das contagens de *L. bulgaricus*, foram submetidos as determinações de média e desvio-padrão. Os valores obtidos foram comparados com os limites estabelecidos na legislação, sendo determinado o percentual de amostras fora do padrão. Além disso, os dados das contagens foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA). A comparação entre as médias foi feita utilizando o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 pH e acidez

O teste de acidez é de grande importância no controle dos processos, durante a elaboração de vários produtos lácticos. Os resultados das análises de pH e acidez (% de ácido láctico) dos iogurtes naturais comerciais das duas marcas (V e B) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado da análise de pH e acidez em iogurtes naturais da marca V e B.

AMOSTRA V		AMOSTRA B	
pH	Acidez (% ácido láctico)	pH	Acidez (% ácido láctico)
4,00	1,07	4,20	1,06
4,21	1,23	4,45	1,11
3,84	1,35	4,20	1,03
4,08	1,14	3,76	1,21
4,21	1,19	4,30	1,21
Média	4,07±0,16	1,20±0,10	4,18±0,26

Fonte: Autor, 2021.

Os resultados de pH oscilaram entre 3,84 e 4,21 na marca V e de 3,76 a 4,45 na marca B, demonstrando pela média, que a marca V é um pouco mais ácida do que a marca B. A legislação brasileira não determina valores máximo ou mínimo para pH de iogurtes, porém em outros países, como Austrália, determina o limite máximo de 4,5 (WHEERATHILAKE *et al.*, 2014). No presente estudo nenhuma amostra ultrapassou esse limite. Com relação ao limite mínimo alguns estudos demonstraram que o pH abaixo de 3,5 acarreta em alguns problemas como a baixa viabilidade de bactérias lácticas devido a acidificação excessiva, problema não apresentado nas amostras analisadas, visto que todas possuíram valores superiores a 3,5 (WANG *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2015; DERVISOGLU *et al.* (2014).

Os valores de acidez variaram de 1,07 a 1,35 para amostras da marca V e de 1,03 a 1,21 para amostras da marca B. Sendo assim, todas as elas atende a exigência da legislação brasileira que determina que o limite mínimo e máximo para a acidez do iogurte seja de 0,6% e 1,5% de ácido láctico, respectivamente (BRASIL, 2007).

Os resultados para pH e acidez obtidos em outras pesquisas realizadas no Brasil indicaram condições variáveis, quando comparados aos resultados obtidos

nesse estudo. Bezerra *et al.* (2019) estudaram três marcas de iogurtes comercializadas em estabelecimentos do município de Coari-AM e encontraram dois deles dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira quanto a porcentagem de ácido láctico e um fora do padrão. Nas análises de pH obteve-se como resultado 4,1, 4,0 e 4,5 dos iogurtes de marca A, B, e C, respectivamente, concluindo que o iogurte da marca C possuía o valor ideal (4,5 - 4,6) para assegurar características tecnológicas adequadas. Em um estudo conduzido por Farias *et al.* (2016) com 7 marcas de iogurtes de morango na cidade de Montes Claros, em Minas Gerais, valores de pH variando de 3,84 a 4,37, e a acidez de 0,51 a 0,71 foram obtidos, tendo somente uma amostra de uma marca apresentado acidez < 0,6% de ácido láctico. Na pesquisa de Silva *et al.* (2016) eles avaliaram 3 marcas de iogurte natural e os valores médios de pH para a marca A variaram de 3,91 a 4,01; para a marca B, de 3,89 e 3,90; e para a marca C, de 3,99 a 4,00. Os valores médios de ácido láctico para a marca A variaram de 1,18 g/100 g a 1,20 g/100 g; para a marca B, de 0,93 g/100 g a 0,98 g/100 g; e para a marca C, de 0,98 g/100 g a 1,02 g/100 g.

5.2 Contagens de Lactobacilos utilizando diferentes técnicas de semeadura

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das contagens de Lactobacilos, em log UFC/g, obtidas a partir de amostras da marca V submetidas as técnicas de semeadura em superfície (SP), em profundidade (PP) e em profundidade com adição de uma sobrecamada de cobertura do mesmo meio (PPC), bem como o resultado da análise estatística através da ANOVA e teste de Tukey.

Ao analisar as amostras da marca V pela Tabela 2, observa-se que utilizando a técnica de semeadura em profundidade com e sem cobertura os valores foram na ordem de 8 log UFC/g, enquanto que na técnica de semeadura em superfície os valores foram na ordem de 7 log UFC/g, havendo, portanto, diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de Lactobacilos. Essa queda na contagem observada quando foi utilizada a semeadura em superfície pode ter ocorrido em virtude da maior exposição dos lactobacilos ao oxigênio. Porém, entre a semeadura em profundidade e a semeadura em profundidade com cobertura não houve diferença significativa ($p > 0,05$), sugerindo que a adição de uma camada de cobertura é dispensável.

Tabela 2. Valores e média das contagens de lactobacilos em iogurtes naturais comerciais da marca V utilizando diferente técnicas de semeadura.

AMOSTRA V (log UFC/g)			
SP	PP	PPC	
7,4771	8,3010	8,3979	
7,8692	8,3979	8,2553	
7,6232	8,3979	8,5441	
7,3979	8,8195	8,8751	
7,9912	8,8325	8,2553	
<u>Média</u>	<u>7,67±0,25^a</u>	<u>8,55±0,26^b</u>	<u>8,47±0,26^b</u>

*Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$) pelo teste de Tukey; SP – semeadura em superfície; PP – semeadura em profundidade; PPC – semeadura em profundidade com cobertura.

Fonte: Autor, 2021.

As colônias nas placas também foram observadas e foi possível perceber que quanto menor a exposição das placas ao oxigênio, maiores foram o tamanho das colônias. Além disso, elas tendem a crescer em maior quantidade e tamanho no fundo da placa. Isso pode ser explicado devido aos lactobacilos preferirem condições anaeróbicas.

As médias das contagens de lactobacilos, em log UFC/g, obtidas a partir de amostras da marca B submetidas as técnicas de semeadura em superfície, em profundidade e em profundidade com adição de uma sobrecamada de cobertura do mesmo meio (MRS), bem como o resultado da análise estatística através da ANOVA e teste de Tukey estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Valores e média das contagens de lactobacilos em iogurtes naturais comerciais da marca B utilizando diferente técnicas de semeadura.

AMOSTRA B (log UFC/g)			
SP	PPC	PP	
6,9031	7,5185	7,4771	
5,7782	6,9542	7,0000	
7,0792	7,4771	7,2041	
5,3010	6,1761	6,5441	
6,2041	6,8976	6,7709	
<u>Média</u>	<u>6,25±0,75^a</u>	<u>7,00±0,54^a</u>	<u>7,00±0,36^a</u>

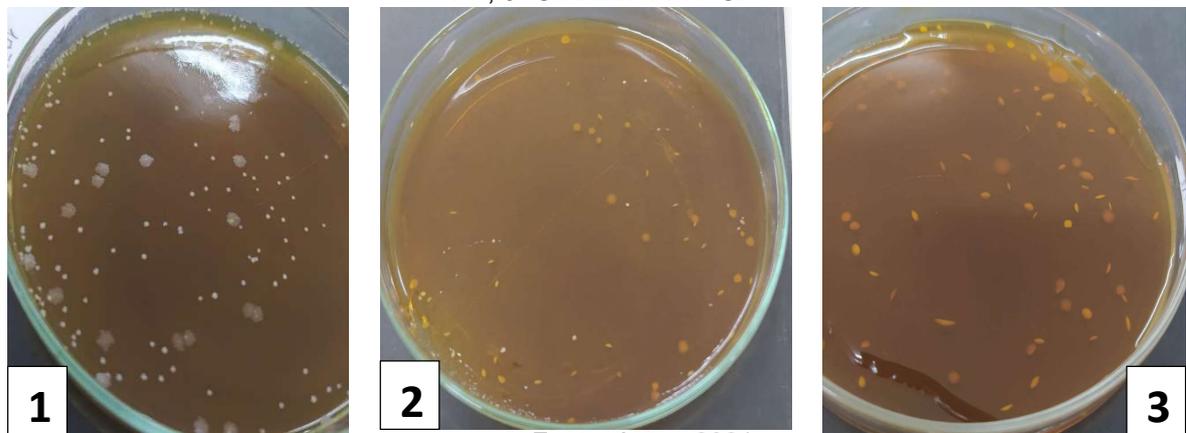
*Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$) pelo teste de Tukey; SP – semeadura em superfície; PP – semeadura em profundidade; PPC – semeadura em profundidade com cobertura.

Fonte: Autor, 2021.

Apesar da análise estatística não ter revelado nenhuma diferença significativa entre as da técnica de semeadura testadas ($p > 0,05$) foram observados valores inferiores para a semeadura em superfície, alguns na ordem de 5 log UFC/g, tendo nas demais técnicas variado entre 6 e 7 log UFC/g.

Apesar das diferenças entre os tratamentos não serem considerados significativos, do ponto de vista estatístico, podem ser observados alterações microbiológicas, visto que nas amostras submetidas a técnica de semeadura em profundidade detectou-se colônias maiores quando comparado com as amostras submetidas a semeadura em superfície que eram mais puntiformes, mesmo não demonstrando diferença nas contagens (Figura 1). Além disso, nas placas de SP ocorreram colônias contaminantes, com característica atípicas, o que pode ser devido a maior exposição ao oxigênio. Também é possível que esses contaminantes tenha dificultado o crescimento de lactobacilos e devido a isso houve uma redução com relação ao tamanho das colônias.

Figura 1. Colônias obtidas do iogurte marca B no meio ágar MRS. 1- Colônias de SP; 2- Colônias de PP; 3- Colônias de PPC.



Fonte: Autor, 2021.

Ao comparar as duas marcas pesquisadas (V e B) pode-se perceber que a marca V obteve contagens maiores que B, apresentando, portanto, mais lactobacilos viáveis. Esse fato pode estar associado ao produto V ter expressado uma maior acidez.

Em estudo realizado por Barros *et al.* (2019), 3 marcas (A, B e C) de iogurtes naturais comercializados na cidade de João Pessoa-PB foram avaliadas, utilizando a semeadura em profundidade com adição de uma camada de cobertura para contagem de *L. bulgaricus*. Esses pesquisadores encontraram no produto A valores variando de

7 a 9 log UFC/g, enquanto nos produtos B e C foram observados valores de 4 a 5 log UFC/g e de 5 a 6 log UFC/g, respectivamente.

Na pesquisa sobre a viabilidade de bactérias lácticas em bebidas elaboradas com iogurte e polpa de manga estudaram a viabilidade de *L. bulgaricus* utilizando a sementeira em profundidade as contagens variaram entre 4,22 e 4,41 log UFC/mL (BARBOSA; GALLINA, 2017). Portanto, o número de lactobacilos em iogurtes de diferentes marcas tem apresentado variações, não sendo raro encontrar alguns resultados que demonstram baixa sobrevivência desses microrganismos. Por isso, a importância da utilização da melhor técnica de sementeira, para recuperar o maior número possível de lactobacilos nas amostras.

5.3 Contagens de lactobacilos em diferentes atmosferas de incubação

Para analisar a influência das condições de atmosfera de incubação nas contagens de *L. bulgaricus* isolados de iogurte natural comercial, os produtos da marca V e B foram incubados em condições aeróbica e microaerofílica, utilizando a técnica de sementeira em profundidade. Na Tabela 4 apresenta-se os valores dessas contagens assim como a média e desvio padrão.

Tabela 4. Valores, média e desvio padrão das contagens de lactobacilos em iogurte natural da marca V e B utilizando duas condições de atmosfera de incubação (aeróbica e microaerofílica).

	AMOSTRA V		AMOSTRA B	
	PPA	PPJ	PPA	PPJ
	8,3010	8,3010	7,4771	7,6721
	8,3979	8,0792	7,0000	7,0414
	8,3979	8,4314	7,2041	7,5441
	8,8195	8,5798	6,5441	6,3010
	8,8325	8,6021	6,7709	6,7993
<u>Média</u>	<u>8,55±0,26^a</u>	<u>8,40±0,22^a</u>	<u>7,00±0,36^b</u>	<u>7,07±0,56^b</u>

*Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey; PPA – Sementeira em profundidade aeróbica; PPJ – Sementeira em profundidade em jarra com sache gerador de microaerofilia.

Fonte: Autor, 2021.

As contagens de *L. bulgaricus* nas amostras da marca V sob as duas condições de atmosfera estudada ficaram em torno de 8 log UFC/g, não sendo observada diferença significativa entre as duas condições de atmosfera ($p > 0,05$). Nesse produto,

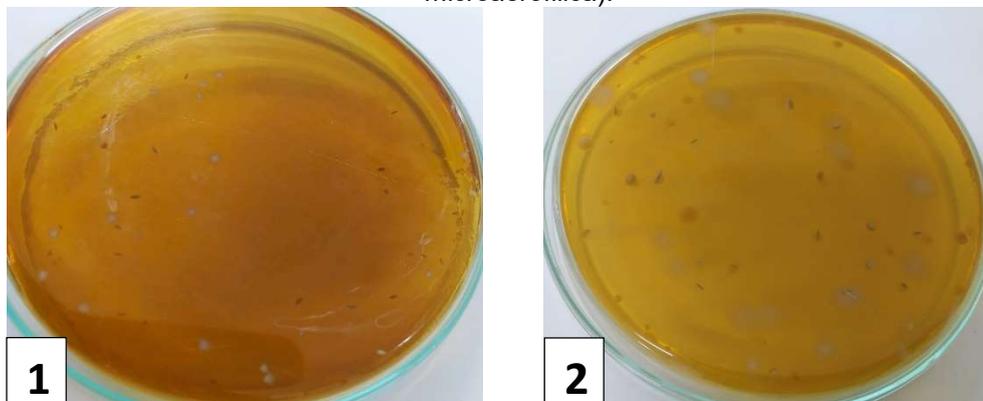
os valores observados foram elevados, suficientes para atender a legislação quanto ao número de bactérias lácticas totais (7 log UFC/g).

As contagens nas amostras da marca B variaram de 6,5 a 7,5 log UFC/g em aerobiose, enquanto em condições microaerofílicas foram observados valores de 6,3 a 7,7 log UFC/g. Nos produtos dessa marca também não foi observada diferença significativa entre as atmosferas de incubação ($p>0,05$), sugerindo não ser necessária a utilização de jarras de anaerobiose para esse grupo de bactérias lácticas, desde que seja utilizada a técnica de semeadura em profundidade.

Ao comparar as contagens obtidas nas duas marcas pesquisadas, observou-se claramente que a marca B apresentava menos lactobacilos que a marca V, demonstrando a influência da marca nas contagens obtidas.

Apesar de não haver diferença significativa no número de lactobacilos nas atmosferas testadas, foi possível observar aumento no tamanho das colônias em condições microaerofílicas, conforme demonstrado na Figura 2, sugerindo que a maior exposição ao oxigênio interfere no desenvolvimento de lactobacilos.

Figura 2. Colônias do produto da marca B (1- com incubação aeróbica e 2- com incubação microaerofílica).



Fonte: Autor, 2021.

Santos (2019) pesquisou sobre a viabilidade de bactérias lácticas em iogurte natural e iogurte adicionado de polpa de morango incubados em jarra de anaerobiose em diferentes prazos de acondicionamento e percebeu variações de 3,18 até 8,15 log UFC/g de *L. bulgaricus* em iogurte natural, tendo contagens maiores entre 5 a 15 dias de acondicionamento. No trabalho de Dudriková, Nagyová e Dičáková (2017), encontraram valores de *L. bulgaricus* em condições anaeróbicas variando de 7,56 a 9,66 log UFC/g com 21 dias de estocagem e 3 dias de estocagem, respectivamente,

enquanto no estudo de Barbosa e Gallina (2017) a viabilidade de *L. bulgaricus* utilizando a semeadura em profundidade com incubação aeróbica as contagens variaram entre 4,22 e 4,41 log UFC/mL.

Em outra pesquisa sobre a viabilidade de diferentes tipos de iogurte foi realizada uma comparação similar a desse estudo, pois foi comparado duas atmosferas de incubação, a aeróbica e a anaeróbica, porém na incubação aeróbica não foi possível distinguir as bactérias lácticas presentes, sendo possível apenas na incubação anaeróbica, a qual encontrou 7,38 log UFC/g de *L. bulgaricus* (BIROLLO; REINHEIMER; VINDEROLA, 2000).

6 CONCLUSÃO

Quanto as análises de pH e acidez nos iogurtes, as amostras apresentaram resultados satisfatórios, atendendo aos requisitos da legislação.

Com base nos resultados obtidos, contagens de lactobacilos em iogurtes naturais podem ser obtidas de forma satisfatória quando for utilizada a técnica de semeadura em profundidade, com incubação aeróbica, tendo em vista que neste trabalho não foram observadas diferenças significativas quando as amostras foram incubadas aerobicamente ou em microaerofilia.

Ainda, foi percebido que a técnica de semeadura em superfície favoreceu a ocorrência de bactérias contaminantes e a obtenção de números mais baixos nas contagens, especialmente nas amostras da marca B, e por essa razão, não seria recomendável adotá-la.

Em contrapartida, foi notório que ao reduzir a exposição ao oxigênio, tanto na atmosfera de incubação quanto nas técnicas de semeadura, houve um aumento no tamanho das colônias, mesmo não alterando de forma significativa a quantidade, mostrando um melhor crescimento. Além disso, quando as amostras são submetidas a técnica de semeadura em superfície, as mesmas apresentaram colônias menores e com características duvidosas que podem ser melhor observadas em estudos posteriores com uma análise morfológica mais específica, podendo ser uma cultura selvagem ou até um contaminante do ar, uma vez que fica mais exposto ao oxigênio. Sendo assim, ratifica-se que não é aconselhável o uso da técnica de semeadura em superfície para contagem de lactobacilos em iogurtes.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**, 4. ed. Washington: APHA, 2001.

ARAÚJO, S. V. O. **Implementação de metodologias para a contagem da flora específica do iogurte e de bifidobactérias na empresa SGS Portugal, SA**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa. 62p, 2015.

BARBOSA, P. M; GALLINA, D. A. Viabilidade de bactérias (starter e probióticas) em bebidas elaboradas com iogurte e polpa de manga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 85-95, 1 jun. 2017. *Lepidus Tecnologia*. <http://dx.doi.org/10.14295/2238-6416.v72i2.580>.

BARROS, G. A; COSTA, B. A.; FONTES, V. M. S.; ALMEIDA, H. G.; MACIEL, J. F. Contagem de bactérias lácticas em iogurtes naturais. In: Giselle Medeiros da Costa One. (Org.). **Saúde Interativa**. 1ed. João Pessoa: IMEA, 2019, v. 2, p. 853-871.

BEZERRA, A. C. DA S.; BEZERRA, J. DE S.; SILVA, M. L.; COSTA, C. M.; DOS SANTOS, R. S.; BRAGA, C. S.; SANTOS, I. L. Determinação de pH e acidez de iogurtes comercializados em três estabelecimentos no município de Coari-AM. **Revista Ensino, Saúde e Biotecnologia da Amazônia**, v. 1, n. especial, p. 1, 27 jun. 2019.

BIROLLO, G.A.; REINHEIMER, J.A.; VINDEROLA, C.G.. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 799-805, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0963-969\(00\)00101-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-969(00)00101-0).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n.46 de 23 de novembro de 2007: **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006: **métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**, 2006.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. **Probiotic claims**, Chapter 8, Section 8.7. CFIA, 2009.

CRUZ, A.G. **Efeito da glicose oxidase sobre a viabilidade de bactérias probióticas em iogurte**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2010. 155p.

CRUZ, A.G.; CASTRO, W.F.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A.; CELEGHINI, R.M.S.; RAICES, R.S.L.; OLIVEIRA, C.A.F.; FREITAS, M.Q.; CONTE JÚNIOR, C.A.; MÁRSICO, E.T.. Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. **Food Research International**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 723-728, maio 2013.

DERVISOGLU, M. *et al.* Natamycin content and quality evaluation of yoghurt from small and large-scale brands in Turkey. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 4, p. 254-260, 2014.

DOMINGOS, L.G. **Estabilidade e qualidade de iogurte adicionado de luteína e validação de método para determinação de riboflavina em iogurte**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2010. 79p.

DUALDO, L. C. S.; CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema compact dry tc durante estocagem refrigerada de iogurtes. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 2010.

DUDRIKOVÁ, Eva; NAGYOVÁ, Mária; DIČÁKOVÁ, Zuzana. Survival of *Lactobacillus bulgaricus* and *Bifidobacterium animalis* in yoghurts made from commercial starter cultures during refrigerated storage. **Potravinarstvo**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 597-601, 30 out. 2017. HACCP Consulting. <http://dx.doi.org/10.5219/758>.

ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 2019, João Pessoa. **Educação para democracia: desafios para fortalecimento do ensino, pesquisa e extensão na UFPB**. João Pessoa: Editora UFPB, 2019.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion. **EFSA Journal**, v.8, p.1763-1781, 2010.

FAO/WHO. **Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada; 2002.

FARIAS, P. K. S.; NOGUEIRA, G. A. B.; DOS SANTOS, S. G. A.; PRATES, R. P., & DE SOUZA, C. N. Contagem de bactérias lácticas em iogurtes comerciais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 38-44, 2016.

GUIMARÃES, P. C. M. **Isolamento e caracterização bioquímica de culturas lácticas obtidas do queijo marajoara**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

HAYEK, S.A. E IBRAHIM, S.A. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, p.73-87, 2013.

HORIUCHI, H., SASAKI, Y. Short Communication: Effect Of Oxygen On Symbiosis Between *Lactobacillus Bulgaricus* And *Streptococcus Thermophilus*. **Journal Of Dairy Science**, v.95, n.6, p.2904-2909, 2012.

ISO- *International Standard Organization* (2003) **Yogurt – Enumeration of Characteristic Microorganisms – Colony-count Technique at 37 Degrees C** (ISO 7889:2003). Geneva, Switzerland: International Organization of Standardization (ISO 117:2003).

KLEIN, G.; PACK, A.; BONNAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KUMAR, A.; KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated Lactobacillus. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 667-675, 2016.

PEREIRA, B. S. **Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado**. 2012. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SANTOS, E. C. da C. **Avaliação da viabilidade de Lactobacillus Delbrueckii Subsp: Buus e Streptococcus Thermophilus no iogurte**. Orientador: Stefania Marcia de Oliveira Souza. 2019. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, 2019.

SANTOS, J.; VASCONCELOS, M. de F. M.; OLIVEIRA, G. L. S.; SILVA, V. da C.; BASÍLIO JÚNIOR, I. D.; PAGANI, A. A. C. Avaliação dos compostos bioativos e ação antioxidante do iogurte de beterraba com limão. **Brazilian Journal of Development**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 29301-29311, 2020.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**; v.83, n.4, p.894-907, 2007.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

SILVA, F. C. G.; DALAQUA, S.; AZEVEDO, E. C.; CAMPOS, G. M.; RAGHIANTE, F.; MARTINS, O. A. Perfil do ácido láctico no prazo de validade de iogurte natural integral. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.4, p. 595 –603, out -dez 2016.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATH, K. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.3, p.117-124, 2004.

TAMIME, A. Y. **Fermented Milks**. Blackell Science Ltd., Oxford, UK, p.1 – 12, 2006.

URIOT, O.; DENIS, S.; JUNJUA, M.; ROUSSEL, Y.; DARY-MOUROT, A.; BLANQUET-DIOT, S. Streptococcus thermophilus: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 74-89, 2017.

VIDAL, A. C; NETTO, A. S. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

WANG, X. *et al.* ATPase-Defective Variants of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Contribute to Inhibition of Postacidification of Yogurt during Chilled Storage. **Journal of food science**, v. 78, n. 2, p. M297-M302, 2013.

WEERATHILAKE, W. A. D. V. *et al.* The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2014.

XU, Z.; LI, S.; GONG, G.; LIU, Z.; WU, Z.; MA, C. Influence of different acidifying strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the quality of yoghurt. **Food science and technology research**, v. 21, n. 2, p. 263-269, 2015.