

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CONFORMIDADE DE DIFERENTES LEITES FERMENTADOS COM A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE ALIMENTOS

Profile assessment of conformity of different fermented milks with Brazilian food legislation

Tatiana Ferreira ARAÚJO¹
Mônica de Souza Lima Sant' ANNA¹
Vivian Carolina RODRIGUES²
Érika Carla COSTA²
Hudsara Aparecida de Almeida PAULA¹
Tatiana Fiche Salles TEIXEIRA³

SUMÁRIO

O Leites fermentados são produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios. Entre os parâmetros exigidos, destaca-se a acidez titulável e a contagem de bactérias lácticas presentes no produto final. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de conformidade de diferentes leites fermentados com a legislação brasileira de alimentos com relação aos parâmetros microbiológicos e de acidez. Foram adquiridas amostras de sete marcas de leites fermentados comercializadas em Viçosa, Minas Gerais. Para cada marca, foram adquiridas três amostras em dias aleatórios, e em seguida analisadas. Foram feitas diluições seriadas e plaqueadas em quatro meios: MRS, Rogosa, PDA e PCA. Após o período de incubação, foram feitas contagens e, as colônias com morfologia característica crescidas em MRS e Rogosa foram isoladas e estriadas em agar sólido para confirmação de pureza das colônias, colorações de Gram, morfologia e catalase. Em cada amostra, foram determinadas acidez titulável e pH. Todas as amostras apresentaram valores de pH e acidez de acordo com a legislação. Dentre as sete amostras avaliadas, cinco delas (71,5%) especificam na embalagem a espécie do micro-organismo veiculado, porém apenas uma delas (14,3%) menciona a contagem de micro-organismos esperada na porção do produto. Em relação à contagem de micro-organismos todas as amostras apresentaram conformidade com a legislação vigente. Os leites fermentados comercializados no mercado mineiro local atendem aos critérios de identidade e qualidade preconizados na legislação de leites fermentados.

Termos para indexação: leite fermentado, bactérias lácticas, contagem.

1 INTRODUÇÃO

Leites fermentados são produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios de acordo com a resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA) no qual define seus padrões de identidade e qualidade.

Entre os parâmetros exigidos, destaca-se a acidez titulável e a contagem de bactérias lácticas presentes no produto final. Para atenderem aos parâmetros exigidos esses produtos devem apresentar, no mínimo, o número de 10^6 UFC/g de bactérias lácticas totais e acidez entre 0,6 a 2,0% de ácido láctico (BRASIL, 2000).

O documento lista ainda os microrganismos utilizados na fabricação de leites

-
- 1 Estudante de Doutorado do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa Email: monicasantana@gmail.com.
 - 2 Estudante de Mestrado do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.
 - 3 Estudante de Doutorado do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

fermentados, que por sua atividade contribuem para determinação das características do produto final, dentre os quais: *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*), *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus ssp* além das espécies *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (BRASIL, 2000). A seleção cuidadosa das estirpes empregadas e o monitoramento do processo de fabricação são necessários para controlar os produtos de metabolismo bacteriano como diacetil, acetaldeído e ácido láctico e o pH final, pois esses fatores influenciam diretamente na taxa de sobrevivência e na viabilidade da bactéria (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Algumas dessas espécies como *L. acidophilus* e *L. casei* e *Bifidobacterium ssp.*, pertencem ao grupo de bactérias probióticas, definidas como micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; BRASIL, 2008). Por sua vez, alimentos carregando bactérias probióticas podem ser classificados como funcionais.

Um alimento funcional é "aquele alimento semelhante em aparência a um alimento convencional (bebida, matriz alimentar), consumido como parte da dieta usual, que contém componentes biologicamente ativos com benefícios fisiológicos demonstrados e oferece o potencial de reduzir riscos de doenças crônicas, além de suas funções nutricionais básicas" (FAO, 2007). Os produtos de laticínios são considerados os carreadores universais de bactérias probióticas e os leites fermentados ocupam lugar de destaque nessa função. A funcionalidade desses produtos é garantida quando os mesmos carregam no mínimo um milhão de células por grama. No entanto, nem sempre esses números são confirmados nos produtos disponíveis no mercado, como no estudo de Botelho (2005), que avaliou leites fermentados comercializados no Brasil, e de Arai et al. (2002), no exterior, que verificaram que avaliações microbiológicas desses produtos não coincidiam com as concentrações e /ou estirpes indicadas nos rótulos dos produtos.

A partir desse cenário, o objetivo desse estudo foi verificar a conformidade das principais marcas de leites fermentados disponíveis no mercado brasileiro, quanto aos requisitos de acidez titulável, pH e parâmetros microbiológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Sete marcas de leites fermentados foram adquiridas no comércio de Viçosa-MG, mantidas sob refrigeração até o momento das análises físico

químicas e microbiológicas feitas no laboratório de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) na Universidade Federal de Viçosa – UFV. Foram adquiridas três amostras de cada marca, em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

2.1 Análises microbiológicas

Foram feitas diluições seriadas e plaqueadas em quatro meios de cultivo diferentes. Para *Lactobacillus* foram utilizados os meios De Man Rogosa Sharpe (MRS) (MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960) e Rogosa (ROGOSA et al., 1951) incubados a 37°C/48h em anaerobiose. Leveduras foram contadas em agar Potatoes Dextrose Agar (PDA) incubadas a temperatura ambiente por cinco dias.

Após o período de incubação, foram feitas contagens e teste tintorial de Gram. Bactérias Gram positivas e com morfologia característica crescidas em MRS e Rogosa foram isoladas e estriadas em ágar sólido para confirmação de pureza e teste de catalase (BERGEY et al, 1994).

2.2 Análises físico-químicas

Em cada amostra, foram determinadas acidez titulável em porcentagem de ácido láctico e pH por meio de potenciômetro, segundo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (1984).

2.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SAS (Statistical Analysis System) versão 9.1 licenciado para Universidade Federal de Viçosa. Os dados de pH, contagem e acidez titulável das diferentes marcas foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as análises de pH e acidez titulável estão apresentados na tabela 1.

De acordo com a resolução nº 5 do MAPA referente aos padrões de identidade e qualidade para leites fermentados, a acidez titulável desses produtos deve estar entre 0,6 e 2,0% de ácido láctico. O produto 1 apresentou a maior média (1,20% de ácido láctico) e o produto 4 a menor (0,87% de ácido láctico). No entanto, as sete amostras apresentaram-se 100% em conformidade com o preconizado pela Resolução. Os resultados obtidos para as análises de pH e acidez titulável estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Resultado das médias e desvio padrão do pH e acidez titulável das amostras de leites fermentados.

Produto	Acidez titulável	pH
1	1,20 ± 0,07	3,07 ± 0,01
2	0,92 ± 0,05	3,64 ± 0,03
3	1,07 ± 0,37	3,21 ± 1,19
4	0,87 ± 0,02	3,81 ± 0,05
5	1,08 ± 0,03	3,24 ± 0,02
6	1,08 ± 0,02	3,27 ± 0,04
7	0,89 ± 0,11	3,53 ± 0,02

Em relação ao pH, foram encontrados valores entre 3,07 (produto 1) a 3,81 (produto 4). Esse baixo pH é característico de leites fermentados e está relacionado à segurança do produto, uma vez que patógenos geralmente não crescem bem em ambientes ácidos (FERREIRA, 2008).

A acidez e pH do produto final refletem a fisiologia da espécie utilizada na fermentação. Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* tendem a apresentar um melhor crescimento em leite do que bactérias do gênero *Bifidobacterium* e por essa razão é comum um leite fermentado contendo espécies de *Bifidobacterium*, também carrear espécies de outros gêneros responsáveis pelo processo fermentativo desses produtos.

A amostra 4 descreve em seu rótulo a presença da espécie de *Bifidobacterium animalis*; esse produto foi o que apresentou pH mais elevado e como consequência uma menor acidez, quando comparados aos outros produtos, que carregam bactérias do gênero *Lactobacillus*. MATTILA-SANDHOLM et al. (2002) afirmaram que a capacidade de produção de ácidos orgânicos pelas bifidobactérias em leite é limitada, o que explica as médias mais elevadas de pH nessa amostra.

A seleção cuidadosa das estirpes empregadas e o monitoramento do processo de fabricação são necessários para controlar os produtos de metabolismo bacteriano como diacetil, acetaldeído e ácido lático e o pH final, pois esses fatores influenciam diretamente na taxa de sobrevivência e na viabilidade da bactéria (VINDEROLA et al, 2002; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

O quadro 1 indica o tipo de micro-organismo declarado pelo fabricante e a concentração dos mesmos quando presente. Dentre as sete amostras avaliadas, cinco delas (71,5%) especificam na embalagem a espécie do micro-organismo veiculado, porém apenas uma delas (14,3%) menciona a contagem de micro-organismos esperada na porção do produto, sendo essa uma exigência da legislação para alegação de funcionalidade.

Devido à presença de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em alguns leites

fermentados, estes podem ser classificados como alimento funcional. Para que um alimento seja considerado probiótico e ter alegação funcional em seu rótulo, o mesmo deve atender a portaria nº 398 (de 30 de abril de 1999) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no qual estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Entre essas diretrizes, o produto deve conter e informar as espécies microbianas consideradas probióticas. Atualmente, as espécies listadas são: *L acidophilus*, *L casei shirota*, *L casei variedade rhamnosus*, *L casei variedade defensis*, *L paracasei*, *Lactococcus lactis*, *B bifidum*, *B animalis incluindo a subsespécie B lactis*, *B longum* e *Enterococcus faecium*. Além disso, o rótulo também deveria apresentar as concentrações do micro-organismo probiótico que veicula.

Quadro 1 – Espécies ou gêneros de micro-organismos declarados pelos diferentes fabricantes de leite fermentado no rótulo.

Produto	Micro-organismo	Concentração (ufc/g)
1	Lactobacilos vivos <i>L.casei</i>	Ni
2	<i>L. casei</i> defensis	Ni
3	<i>L. casei</i> Shirota	10 ¹⁰ a 10 ¹¹
4	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Ni
5	Lactobacilos vivos paracasei	Ni
6	Lactobacilos vivos	Ni
7	Lactobacilos	Ni

Ni: não indicado

Somente uma das marcas possui alegação de funcionalidade, descrita em seu rótulo como "Alimento com alegações de propriedades funcionais", "contribui para o equilíbrio da flora intestinal" e "deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis". Para que sejam obtidos os efeitos benéficos da ingestão de probióticos, a ANVISA exige a quantidade mínima viável de 10⁸ a 10⁹ UFC na dose do produto pronto para o consumo.

Na tabela 2 estão apresentadas as médias dos resultados com desvio padrão da contagem de bactérias lácticas das amostras de leites fermentados analisadas.

A resolução nº 5 do MAPA estabelece uma contagem mínima de 10⁶ ufc/mL de bactérias lácticas para leites fermentados. Esse mesmo valor é sugerido pela resolução nº 47/97 do MERCOSUR/

GMC/RES. De acordo com estas Resoluções, 100 % das amostras encontram-se em conformidade para esse quesito.

A comparação das contagens nos meios MRS e Rogosa, indica uma redução da contagem de pelo menos um ciclo log nas amostras 1, 2, 3 e 4 no meio Rogosa. Esse meio, ajustado para o pH 5 com acetato, é mais restritivo para *Lactobacillus*, que crescem em colônias discóides, facilitando sua contagem (KOMIYAMA, 2003). O pH do ágar MRS, por estar mais próximo à neutralidade, permite maior crescimento de bactérias lácticas totais. No entanto, quando as espécies veiculadas pertencem ao gênero *Lactobacillus*, e são probióticas, a contagem total de bactérias em MRS superestima a concentração do gênero, uma vez que outras bactérias lácticas, não probióticas, geralmente são utilizadas para direcionar a fermentação.

As amostras 5, 6 e 7 apresentaram uma pequena variação na contagem no ágar Rogosa, mantendo-se na mesma faixa de crescimento do meio MRS. Essa contagem similar nos dois meios de crescimento provavelmente resulta da presença de espécies de *Lactobacillus* predominando no produto.

Estudos anteriores divergiram do que foi encontrado na presente avaliação. Na avaliação da concentração de *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias viáveis em produtos que declaravam a presença destes micro-organismos verificaram contagens abaixo de 10^5 UFC.mL⁻¹, em grande parte das amostras analisadas (BARRETO et al., 2003). Numa outra, Botelho (2005) obser-

vou que nem todas as espécies declaradas nos rótulos eram encontradas nos produtos, particularmente *L. acidophilus* e *B. bifidum*.

As médias de contagem de leveduras das sete marcas estão indicadas na Tabela 3.

A presença de leveduras em leites fermentados dá uma informação da qualidade da matéria prima utilizada na elaboração dos produtos. De um modo geral, os leites fermentados avaliados apresentaram baixas ou nenhuma contagem, exceto duas marcas que, de acordo com as informações do rótulo, a adição dos ingredientes "preparado de frutas cítricas" e "suco de laranja", o que provavelmente contribuiu para as médias encontradas. A marca 1 não apresentou leveduras nas 3 amostras avaliadas, ao passo que na marca 7, as três embalagens amostradas apresentaram leveduras nas concentrações de 10^2 a 10^5 UFC x mL⁻¹ com média de $5,6 \times 10^4$ UFC x mL⁻¹ do produto. Para as outras marcas, pelo menos uma das embalagens amostradas não apresentou contagens de leveduras.

4 CONCLUSÕES

O leite fermentado comercializado no mercado mineiro local atende aos critérios de identidade e qualidade preconizados na legislação de leites fermentados. Em relação a funcionalidade, o presente estudo mostrou que independente da marca, a contagem encontrada no meio Rogosa para *Lactobacillus* indica que os mesmos seriam adequados para exercer tal função.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão das contagens de bactérias lácticas dos leites fermentados em diferentes meio de cultura.

	UFC/mL	
	MRS	ROGOSA
1	$1,22 \times 10^9 \pm 6,41 \times 10^8$	$1,24 \times 10^8 \pm 1,97 \times 10^8$
2	$9,92 \times 10^8 \pm 8,65 \times 10^8$	$5,05 \times 10^7 \pm 7,34 \times 10^7$
3	$1,32 \times 10^9 \pm 2,91 \times 10^8$	$1,63 \times 10^6 \pm 1,48 \times 10^6$
4	$8,78 \times 10^7 \pm 6,02 \times 10^7$	$5,18 \times 10^6 \pm 2,64 \times 10^6$
5	$1,22 \times 10^8 \pm 7,03 \times 10^7$	$1,44 \times 10^8 \pm 1,35 \times 10^8$
6	$8,98 \times 10^6 \pm 6,35 \times 10^6$	$3,20 \times 10^6 \pm 3,18 \times 10^6$
7	$7,55 \times 10^6 \pm 6,25 \times 10^6$	$1,19 \times 10^6 \pm 1,24 \times 10^6$

Tabela 3 – Médias (n=3) de contagem de fungos filamentosos e leveduras de sete marcas de leites fermentados, em ágar PDA.

Repetições	Amostras - Contagem UFC x mL ⁻¹						
	1	2	3	4	5	6	7
1	<1	<1	2×10^1	<1	<1	<1	$1,7 \times 10^2$
2	<1	1	<1	$1,2 \times 10^2$	<1	<1	$3,8 \times 10^4$
3	<1	<1	<1	$3,1 \times 10^1$	1	1,5	$1,3 \times 10^5$

No entanto, a ênfase a estas propriedades não é utilizada como estratégia de marketing pela maioria dos fabricantes.

O rótulo é um requisito obrigatório, além de exercer função educativa. A educação do consumidor é um processo lento, e informações completas nos rótulos são fundamentais. Dessa forma, seria muito importante que além do micro-organismo, as concentrações dos mesmos fossem indicadas. Espera-se que, com o passar do tempo, os consumidores também exijam que os benefícios esperados sejam veiculados nos rótulos, e que num futuro próximo, mais produtos de leites fermentados estejam no mercado apresentando informações que os direcionem à escolha daquele que mais se adequa à sua necessidade.

SUMMARY

Fermented milks are products derived from fermentation of pasteurized or sterilized milk by proper lactic ferments. Among the parameters required, titratable acidity and total lactic acid count in the final product can be highlighted. The aim of this study was to evaluate the profile of compliance of different fermented milks with Brazilian food legislation with regard to microbiological and acidity parameters. Samples were obtained from seven brands of fermented milk commercialized in Viçosa, Minas Gerais. For each brand, were acquired three samples on random days, and then analyzed. Serial dilutions were made and plated on four media: mRS, Rogosa, PDA and PCA. After the incubation period was completed, plates were counted, and colonies with characteristic morphology observed in MRS and Rogosa medium were isolated and striated in solid agar to confirm purity of the colonies, Gram staining, morphology and catalase. For each sample, titratable acidity and pH were assessed. All samples showed acidic pH values and in accordance with the law. Among the seven samples, five of them (71.5%) specified the microorganism specie present in their product, however only one (14.3%) mentioned the microorganism counting expected in the product's portion. In relation to microorganism counting all the samples were in conformity with the current legislation. Thus, fermented milks commercialized in the local market of Viçosa meet the criteria of identity and quality recommended by specific legislation for fermented milk.

Index terms: fermented milk, lact acid bacteria, count.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.;

MORENO, I. et al. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83-90, 2007.

ARAI, S.; MORINAGA, Y.; YOSHIKAWA, T.; ICHIISHI, E.; KISO, Y.; YAMAZAKI, M.; MOROTOMI, M.; SHIMIZU, M.; KUWATA, T.; KAMINOGAWA, S. L.. Recent trends in functional food science and the industry in Japan. **Bioscience Biotechnology of Biochemical**, v. 66, n. 10, p. 2017-2029, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC International. 14th ed. [S. l.], 1984. 1141p.

BARRETO, G. P. M. et al. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias lácticas totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 120, p. 119-126, 2003.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology**. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de Lactobacilos e Bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. Campinas, 2005, 203 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_allega.html>. Acesso em 30 de novembro de 2010.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999**. Define as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução nº 05, de 13 de novembro de 2000**. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. Brasília, 2000.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas- Caracterização e Aplicação Tecnológica

de Bactérias Láticas Probióticas. In: Ferreira, CLLF, ed. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Suprema Gráfica e Editora, Rio Branco, MG. 7-26p, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

KOMIYAMA, Y. E.; JORGE, C. O. A.; MARTINS, P. A. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, Y.C. Avaliação do meio LAPTg como alternativa para o isolamento de *Streptococcus* do grupo *Mutans* e lactobacilos da saliva. **Revista de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 59-64, 2003.

MAN, J. D., ROGOSA, M. A. AND SHARPE, M. A. Medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology** 23; 130-135, 1960.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN,

R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.

MILNER, J. A. Functional foods: US perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 654s-659s, 2000.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.1, p. 1-21, 2002.

ROGOSA, M., MITCHELL, J. A. AND WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal lactobacilli. **Journal of Bacteriology**, p. 62, 132-133, 1951.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 579-589, 2002.