



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

FERNANDA DIEKMANN MANTOVANI

**BEBIDA E SOBREMESAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS:
VIABILIDADE DO *Lactobacillus casei* NOS PRODUTOS
E SUA RESISTÊNCIA EM CONDIÇÕES SIMULADAS DO
TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO**

Londrina
2014

FERNANDA DIEKMANN MANTOVANI

**BEBIDA E SOBREMESAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS:
VIABILIDADE DO *Lactobacillus casei* NOS PRODUTOS
E SUA RESISTÊNCIA EM CONDIÇÕES SIMULADAS DO
TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lina Casale Aragon Alegro

LONDRINA
2014

FERNANDA DIEKMANN MANTOVANI

**BEBIDA E SOBREMESAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS:
VIABILIDADE DO *Lactobacillus casei* NOS PRODUTOS E SUA
RESISTÊNCIA EM CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO
GASTROINTESTINAL HUMANO**

Dissertação aprovada em trinta de Abril de dois mil e quatorze, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Cíntia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Leandro Freire dos Santos

Londrina, _____

Dedico esse trabalho a todos que, como eu, acreditam em mudanças felizes e na possibilidade de que ao final, tudo dê certo.

Em especial, dedico aos meus pais, Elizeu e Rebeca, e a minha amada avó Hanelore, que sempre acreditaram nos meus passos e no caminho que decidi seguir.

Por fim, dedico a todos os meus amigos, que compartilharam as felicidades das conquistas, as dores de algumas perdas e as insatisfações de objetivos não alcançados, mas que, mesmo conhecendo todos os meus defeitos e fraquezas, continuaram ao meu lado e hoje sei que posso chamá-los de verdadeiros amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, à minha irmã, à minha sobrinha.

À minha orientadora, às filiais, às matrizes.

Aos meus amores, aos meus amigos, à minha equipe.

Às minhas dores, às minhas alegrias imensas.

Às canções, aos cantos, à vida.

Continue faminto, continue tolo.

Steve Jobs

MANTOVANI, Fernanda Diekmann. **Bebida e sobremesas lácteas probióticas: viabilidade do *Lactobacillus casei* nos produtos e sua resistência em condições simuladas do trato gastrointestinal humano.** 2014. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Universidade Norte do Paraná, Londrina. 2014.

RESUMO

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas são capazes de conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. A administração correta e regular pode assegurar a prevenção de patologias, regulação da microbiota intestinal, distúrbios do metabolismo gastrointestinal, imunomoduladores e na inibição da carcinogênese. Porém, para que exerçam esses efeitos benéficos, os alimentos devem conter culturas probióticas viáveis, com populações acima de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g ou mL, durante todo período de validade do produto, além de sobreviverem à passagem pelo trato gastrointestinal. Esta pesquisa propôs a elaboração de um flan de chocolate, um flan de maracujá e uma bebida láctea sabor chocolate, todos probióticos. Para isso, no dia seguinte da fabricação dos produtos lácteos e após 7, 14 e 21 dias, foram determinados o pH, a acidez e a viabilidade do micro-organismo probiótico *Lactobacillus casei* nos três produtos supracitados. Nos mesmos períodos, a viabilidade desse micro-organismo foi avaliada após passagem em caldos que simularam as condições do trato gastrointestinal (fase gástrica, primeira fase entérica e segunda fase entérica). A fim de caracterizar os produtos elaborados, análises de composição centesimal foram realizadas após um dia da data de fabricação. Todo o experimento foi realizado em triplicata, e os dados avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o programa Statistica. O *Lactobacillus casei* manteve-se viável e em populações acima de 6 log UFC/g ou mL nos três produtos avaliados, apresentando maiores populações na bebida láctea (7,89 UFC/mL). Quando submetido à simulação das condições gástricas, a população do *Lactobacillus casei* nos diferentes produtos apresentou redução entre 4 e 5 ciclos logarítmicos. A bebida láctea e o flan de maracujá apresentaram populações maiores (7,89 UFC/mL e 7,33 UFC/g, respectivamente) do *Lactobacillus casei* quando comparadas com o flan de chocolate (6,68 UFC/g). Apesar disso, o micro-organismo probiótico proveniente deste último, quando submetido às condições entéricas, recuperou-se mais rapidamente que os presentes nos outros produtos.

Palavras-chave: Flan. Probiótico. Estômago. Intestino delgado. Intestino grosso.

MANTOVANI, Fernanda Diekmann. **Probiotic milk drink and desserts: viability of *Lactobacillus casei* on products and their resistance in simulated human gastrointestinal tract conditions.** 2014. 55 f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Northern University of Paraná, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Probiotics are living micro-organisms capable of producing beneficial effects on their host when consumed in adequate amounts. Proper and regular administration can ensure for prevention of pathologies, regulation of intestinal microflora, gastrointestinal metabolism disorders, immunomodulatory and inhibition of carcinogenesis. However, to exert these beneficial effects, food must contain viable probiotic cultures with populations above 10^6 Colony Forming Units (CFU) / mL or g throughout the period of validity of the product as well as survive the passage through the gastrointestinal tract. This research proposed the development of a chocolate flan, a passion fruit flan and a chocolate flavored milk drink, all probiotics. For this purpose, the next day of the the dairy products manufacture and after 7, 14 and 21 days, the pH, acidity and viability of probiotic micro-organism *Lactobacillus casei* in the three products were determined. In the same periods, the viability of this micro-organism was evaluated after passage in broth that simulated the conditions of the gastrointestinal tract (gastric phase, first enteric phase and second enteric phase). In order to characterize the products produced after a day of the date of manufacture an analyzes of chemical composition were conducted. The entire experiment was performed in triplicate and the data were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, using the Statistica program. The *Lactobacillus casei* remained viable in populations above 6 log CFU g or mL in the three product were determined, with higher populations in milk drink (7,89 UFC/mL). When subjected to simulated gastric conditions, the population of *Lactobacillus casei* in the different products decreased between 4 and 5 log cycles. A milk drink and passion fruit flan had higher populations (7,89 UFC/mL e 7,33 UFC/g, respective) of *Lactobacillus casei* compared with the chocolate flan (6,68 UFC/g). However, the probiotic microorganism from the latter, when subjected to enteric conditions, recovered faster than those present in other products.

Key-words: Flan. Probiotics. Stomach. Small intestine. Large intestine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 Micro-organismos Probióticos	12
3.1.1 <i>Lactobacillus casei</i>	16
3.2 Mercado de Exportação e Importação de Soro no Brasil	19
3.2.1 Bebidas Lácteas Probióticas	20
3.3 Mercado de Sobremesas Lácteas.....	22
3.3.1 Sobremesas Lácteas Probióticas	23
4 ARTIGO.....	25
5 CONCLUSÃO.....	48
6 REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O termo probiótico surgiu em 1965, considerando-o como uma “substância secretada por um micro-organismo para estimular o crescimento de outro” (LILLY; STILLWELL, 1965). A partir desta data, diversas definições foram publicadas com o intuito de conceituar probióticos (SANDERS, 2003). Entretanto, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations) e a Organização Mundial de Saúde (OMS - World Health Organization), a atual definição internacionalmente aceita é a que considera probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Os probióticos estão ativamente inseridos no crescente mercado de alimentos funcionais, que visam à saúde do consumidor, auxiliando principalmente no equilíbrio da microbiota intestinal. O mercado global de alimentos probióticos vem apresentando, desde a última década, uma crescente movimentação. Análises recentes informam um possível aumento de 6,8% ao ano nos próximos cinco anos, direcionado pela região da Ásia-Pacífico, além do Japão, tradicionalmente forte. O mercado está em cerca de 27,9 bilhões de dólares, com previsão de alcançar 44,9 bilhões de dólares em 2018, com uma demanda futura de 32,2 bilhões de dólares para produtos lácteos, também em 2018 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES - ABIAD, 2012).

Dentre os fatores benéficos promovidos pelos micro-organismos probióticos, além do controle da microbiota intestinal, citado anteriormente, há a estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; a promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; a diminuição da população de patógenos por meio da produção dos ácidos acético e láctico, de bacteriocinas; a promoção da digestão de lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; o estímulo do sistema imune; o alívio da constipação e o aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD,

2006), ressaltando-se que esses efeitos não estão correlacionados à cura de doenças, mas sim, à prevenção (ROBERFROID, 2007).

Entretanto, para que esses efeitos benéficos ocorram, a dose mínima diária da cultura probiótica ingerida deve ser de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), o que corresponde ao consumo diário de 100 g ou mL de produto que contenha de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005).

Para isto, a bactéria probiótica selecionada deve manter-se viável durante a fabricação e armazenamento dos produtos e, após sua ingestão, frente à ação do ácido, bile, pepsina e enzimas pancreáticas, para que assim possa sobreviver à passagem pelo estômago, aderir-se e colonizar a mucosa intestinal, impedindo a produção de toxinas e/ou a invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Desta maneira, é importante avaliar a sobrevivência do micro-organismo probiótico, uma vez que vários fatores podem interferir em sua viabilidade, como, ação do ácido, bile, pepsina e enzimas pancreáticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, o estado fisiológico dos micro-organismos probióticos adicionados ao produto, às condições físicas de estocagem, a composição química do produto no qual os micro-organismos serão adicionados e as possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas *starter* (SHAH; RAVULA, 2000; HELLER, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* em produtos lácteos, fermentado (bebida láctea sabor chocolate) ou não fermentados (flan de chocolate e maracujá), durante a vida de prateleira, bem como a sua sobrevivência em condições de simulação do trato gastrointestinal.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar as populações do *Lactobacillus casei* na bebida láctea fermentada e no flan, um produto não fermentado, ambos sabor chocolate, durante a vida de prateleira e após passagem em caldos simulando o trato gastrointestinal.

Comparar as populações do *Lactobacillus casei* nos flans de diferentes sabores (chocolate e maracujá), durante a vida de prateleira e após passagem em caldos simulando o trato gastrointestinal.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Micro-organismos Probióticos

No século XX, o pesquisador russo, Élie Metchnikoff, popularizou o consumo de iogurte após observar os hábitos alimentares de povos búlgaros, supondo que essa matriz alimentar fosse capaz de combater os efeitos deletérios de bactérias patogênicas presentes na microbiota intestinal humana e assim promover a longevidade da população, “Teoria da Longevidade”. Metchnikoff descobriu que em uma população de aproximadamente um milhão de habitantes, cerca de 1.600 búlgaros ultrapassavam os 100 anos, mesmo sendo considerados como uma civilização desfavorecida da Europa, que sofriam com as constantes invasões e dominações, além de geograficamente serem prejudicadas em decorrência de um árido território, justificando assim o consumo daquele alimento. Élie, isolou um determinado bacilo e dedicou todos os esforços para descobrir suas particularidades. O consumo de leite fermentado por *Lactobacillus* favorecia uma competição deste micro-organismo benéfico contra outros não tão benéficos. Ao *Lactobacillus* foi dado o nome de *Bacillus bulgaricus*, que mais tarde recebeu uma nova denominação, *Lactobacillus bulgaricus* (HIRSCH; HIRSCH, 1982).

Recorrente à “Teoria da Longevidade” e a contribuição ao estudo sobre os princípios da imunologia, Élie Metchnikoff em 1908 recebeu o prêmio Nobel (LAGERKVIST, 2003).

O surgimento desta teoria estimulou extensivos estudos sobre o assunto. Na mesma época, um pediatra francês, Henry Tissier, analisando fezes de crianças diarreicas e não diarreicas, verificou que fezes de crianças diarreicas possuíam uma quantidade inferior de bactérias em forma de Y, ou forma bífida, quando comparadas a fezes de crianças não diarreicas, sugeriu-se então, isolar essa cepa e administra-la em crianças diarreicas (GUARNER, 2011). Partindo dessa hipótese, em 1930, em um cenário com elevado índice de mortalidade infantil por infecções gastrointestinais, um médico japonês, Minoru Shirota, iniciou seus estudos, buscando por uma cepa que conseguisse sobreviver à passagem pelo estômago, aderir e colonizar o epitélio intestinal,

inibindo assim, a proliferação de bactérias nocivas, promovendo um equilíbrio da microbiota intestinal. Esse micro-organismo foi chamado de *Lactobacillus casei* Shirota e passou a ser vinculado no Japão em 1950 em um produto conhecido como “Yakult”. Para garantir o consumo, o mesmo era entregue em sistema domiciliar pelas chamadas “Yakult Ladies”. No Brasil, a vinculação iniciou-se em 1966 (ALVAREZ-OLMOS, 2001).

O aumento da expectativa de vida para 74,6 anos, a iniciativa de abandono do sedentarismo e a busca por uma melhor qualidade de vida aliada a saúde, tornaram-se quesitos de grande valia para a constante demanda por alimentos funcionais, que visam ao mesmo tempo, saúde e bem estar (SAAD et al., 2011; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). Entretanto, tecnologicamente, esses alimentos não devem se diferenciar daqueles considerados não funcionais, ou seja, sem adição de componentes bioativos, como os probióticos, nos quesitos textura, sabor e aroma (ARES; GIMÉNEZ; GÁMBARO, 2009).

Diversas definições sobre probióticos já foram publicadas. A atual e internacionalmente aceita é a que considera probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Dentre os quais: balanceamento da microbiota intestinal; digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Para que esses esperados efeitos benéficos ocasionados pelo consumo de probióticos ocorram, alguns critérios de seleção para a incorporação à matriz devem ser respeitados e criteriosamente acompanhados, como requisito de manter a integridade e principalmente a funcionalidade do produto. Segundo relatado por Saad et al. (2011) e Ferreira (2012), para que os probióticos atinjam os sítios desejados e exerçam a função almejada, essas bactérias obrigatoriamente devem conter indicações de segurança, não

patogênicos; capacidade de se aderir ao epitélio da mucosa intestinal, bem como coloniza-la; resistir a atividade do suco gástrico, bile, pepsina e enzimas pancreáticas; sobreviver às condições de processamento e armazenamento, respeitando assim, a compatibilidade e adaptabilidade entre as cepas e os referidos veículos selecionados (SAAD et al., 2011).

Porém, o esperado efeito benéfico só ocorrerá se as bactérias probióticas atingirem um número mínimo estipulado. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo deva apresentar entre 10^8 e 10^9 UFC do probiótico utilizado, referente à quantidade de micro-organismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g ou mL de produto que contenha entre 10^6 e 10^7 UFC/g ou mL (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005), durante todo o prazo de validade.

Segundo Komatsu, Buriti e Saad (2008), o modo exato do mecanismo de ação dos probióticos e seus efeitos ainda é incerto. Como descrito por Fuller (1989), existem três possíveis mecanismos de atuação: o primeiro deles é a supressão do número de células viáveis mediante a formação de compostos com atividade antimicrobiana; o segundo mecanismo refere-se à modificação do metabolismo microbiano, tanto pelo aumento ou pela diminuição das funções enzimáticas; e o terceiro baseia-se no aumento da imunidade do hospedeiro por meio do estímulo para produção de anticorpos.

Ainda de acordo com Sleator e Hill (2009), bacteriocinas produzidas por micro-organismos probióticos podem destruir patógenos invasores, através da lise de suas células (Figura 1A); células probióticas podem mimetizar receptores de superfície, impedindo a adesão do patógeno à membrana celular do hospedeiro (Figura 1B); micro-organismos probióticos podem neutralizar toxinas produzidas por micro-organismos patogênicos, dentro do organismo humano (Figura 1C).

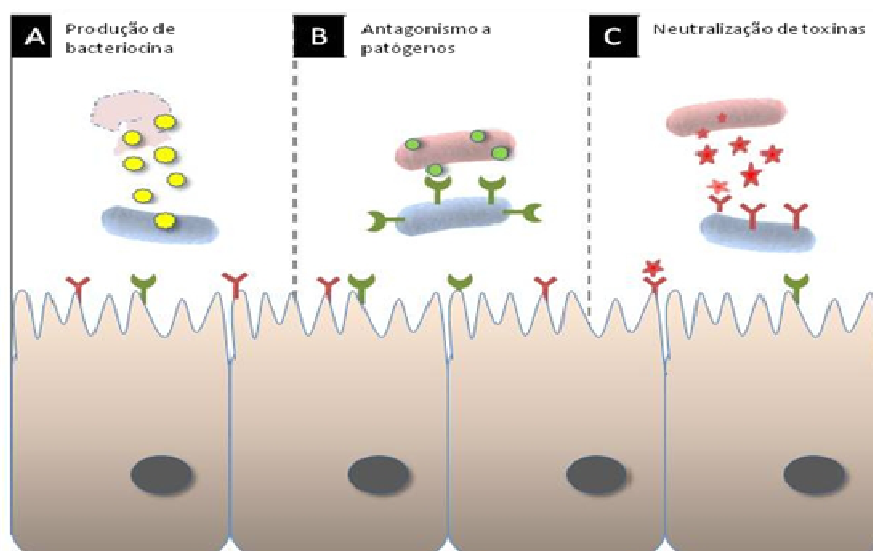


FIGURA 1. Mecanismos de atuação dos probióticos.
Fonte: Sleator; Hill (2009).

A indústria de laticínios é um dos segmentos que apresenta um maior número de lançamentos de produtos funcionais contendo culturas probióticas, os quais são produzidos, principalmente, no Japão, Comunidade Europeia e nos Estados Unidos da América (EUA). Os produtos mais comuns são leites fermentados, iogurtes, sobremesas geladas e queijos, nos quais os probióticos são adicionados como aditivos além da cultura *starter* convencional (GOMES; MALCATA, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; SAAD, 2006).

Dentre os probióticos estudados e implantados como ingredientes em produtos funcionais, destacam-se as bactérias lácticas, entre elas, os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (MENEZES et al., 2013).

O gênero *Bifidobacterium*, caracteriza-se por serem anaeróbios, Gram-positivos, sensíveis a ambientes ácidos e pH inferior a 5,0, com condições ótimas de crescimento em temperatura de 37° a 41°C. Constituem a microbiota predominante em crianças logo após o nascimento. Devido à capacidade de metabolizar glicose pela via frutose-6-fosfato e produzir ácido acético e lático, sem formação de gás carbônico (CO₂) diferenciam-se de outras bactérias lácticas. A sua veiculação na indústria alimentícia, exige técnicas especiais, porque, além de serem sensíveis à acidez e a presença de oxigênio, a capacidade de liberar ácido acético, pode prejudicar sensorialmente o produto, além da possível redução em sua vida de prateleira (FERREIRA, 2012).

Atualmente, podem ser encontradas cerca de 170 espécies e 27 subespécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*; descritos como um grupo heterogêneo na forma bacilar ou coco-bacilos, Gram-positivos, não-esporulados, podendo ocorrer isoladamente ou em pares ou ainda formando correntes de tamanhos variados (FERREIRA, 2012). Sua divisão está baseada em particularidades fermentativas: obrigatoriamente homofermentativas (fermentam glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato, como exemplo, *Lactobacillus acidophilus*), facultativamente heterofermentativas (fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses micro-organismos também fermentam pentoses, através de uma fosfoacetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético, como exemplo, *Lactobacillus casei*) e obrigatoriamente heterofermentativas (fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias, como exemplo, *Lactobacillus fermentum*). Amplamente distribuídos no meio ambiente, especialmente em alimentos vegetais, leite, trato gastrointestinal e genital com condições ótimas de crescimento em pH entre 5,5 e 6,3 e temperatura entre 30° a 40°C (SAAD, 2006).

3.1.1 *Lactobacillus casei*

Gram-positivos, não esporulados com baixa capacidade de tolerar a presença de oxigênio (FERREIRA, 2012).

Segundo Buriti e Saad (2007), o grupo *Lactobacillus casei* compreende bactérias lácticas, aptas a colonizar vários ambientes, como, cavidade oral, trato gastrointestinal, cavidade genital, alimentos vegetais.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo deva apresentar entre 10^8 e 10^9 UFC do probiótico utilizado, referente à quantidade de micro-organismos viáveis que deve ser ingerida diariamente (BRASIL, 2008), o que corresponde ao consumo diário de 100 g ou mL de produto que contenha de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005), para obtenção dos efeitos benéficos. Dentre

os quais: proteção contra agentes patogênicos devido à adesão dos micro-organismos probióticos aos sítios de ligação da mucosa intestinal; balanceamento e estabilização da microbiota intestinal; ativação da imunidade local e sistêmica; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas (SAAD, 2006).

Silva et al. (2012) verificaram que a população de *Lactobacillus casei* em um flan de chocolate armazenado por 15 dias a 4°C mostrou-se superior a 10^9 UFC/g durante a vida de prateleira, valor este, superior ao estabelecido pela legislação brasileira para um alimento probiótico. Em relação ao seu comportamento em condições simuladas do trato gastrointestinal, a população manteve-se acima de 10^6 UFC/g. Portanto, o *Lactobacillus casei*, neste estudo, mostrou-se relativamente resistente às condições em que foi submetido, tendo a matriz alimentar escolhida para o desenvolvimento desta pesquisa uma ótima opção para a incorporação do micro-organismo probiótico.

No estudo de Magariños et al. (2008), sobremesas lácteas a base de leite acrescidas com molho de cranberry estocadas por 14 dias a 5°C foram elaboradas com a adição de *Lactobacillus casei* Shirota e *Bifidobacterium animalis* Bb12. Ambas as concentrações dos inóculos permaneceram em 10^8 UFC/g.

Faria, Benedet e Guerroue (2006) analisaram leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*, e após 30 dias de armazenamento a 5°C, notaram que a cepa selecionada permaneceu viável, com concentração final equivalente a 10^8 UFC/mL. Em outro estudo, suplementado com *Bifidobacterium longum*, os mesmos autores observaram que ambas as cepas permaneceram com concentrações equivalentes a 10^9 UFC/mL em um mesmo decorrer de tempo e temperatura de armazenamento em relação ao estudo supracitado.

Dentre as características deste micro-organismo probiótico, destaca-se a capacidade de atividade antimicrobiana. Calderón et al. (2007), observaram em iogurtes (contendo *Lactobacillus casei* CRL 431 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 730 em co-cultura, adicionados ou não de *Lactobacillus rhamnosus* LR 35) uma diminuição da população de *Staphylococcus aureus* e de *Listeria monocytogenes*, em níveis não detectáveis, após 12 dias de armazenamento a 4°C. No mesmo estudo, a redução da população de

Escherichia coli O157:H7, em níveis não detectáveis, ocorreu aos 8 dias de armazenamento a 4°C. Similarmente, Salvatierra et al. (2004) observaram uma queda da população de *Staphylococcus aureus* para níveis não detectáveis após 7 dias de armazenamento a 5°C.

Fatores promotores à saúde também podem ser vinculados a essa cepa, decorrente a capacidade de sobreviver à ação do ácido, bile, pepsina e enzimas pancreáticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como, adesão e colonização da mucosa intestinal impedindo que bactérias patogênicas o façam (HUDAULT et al., 1997). Afirmação esta, que pode ser observada através dos resultados obtidos por Guérin-Danan et al. (1998). Os autores avaliaram o efeito da suplementação de leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* (DN-114 001) pelo período de 30 dias a 5°C sobre os índices metabólicos e da microbiota intestinal de crianças saudáveis com idades entre 10 e 18 meses. Houve um aumento significativo da percentagem de crianças que apresentaram populações deste micro-organismo superiores a 10⁶ UFC/g nas fezes. O mesmo pôde ser observado por Rochet et al. (2006) após analisarem fezes de adultos saudáveis que receberam leite fermentado com a mesma cepa utilizada no trabalho de Guérin-Danan et al. (1998) por 30 dias.

A permanência de uma microbiota intestinal equilibrada e a existência de um tecido intestinal intacto levaria a uma probiose almejada por todos, porém, o estresse do dia-dia, a alimentação inadequada, a execução de hábitos não saudáveis, o uso prolongado de antibioticoterapia e até mesmo o próprio processo de envelhecimento propiciam a um desequilíbrio da microbiota intestinal, disbiose. Para reverter esse quadro, o consumo de micro-organismos probióticos, especialmente *Lactobacillus casei*, incorporado a uma matriz alimentar, poderia reverter esse quadro, já que trata-se de uma cepa com capacidade de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal, aderir-se e colonizar a mucosa intestinal, além de resistir aos processos de produção e armazenamento, conferindo assim, os esperados efeitos benéficos aos consumidores.

3.2 Mercado de Exportação e Importação de Soro no Brasil

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, o mercado de lácteos mudou muito nos últimos anos. Em 2008, o país vivenciava uma expectativa de crescimento contínuo das exportações, influenciando o superávit na balança comercial (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2013).

Advindo da crise internacional, o cenário da economia brasileira sofreu alterações que ainda vigoram no mercado brasileiro de exportações de leite e derivados. Em 2008, foi exportado o total de US\$ 540.880,1 milhões de derivados lácteos, já em 2012, houve uma redução, com exportação total de US\$ 118.955,7 milhões. Quando comparado a 2011, a exportação foi de US\$ 121.052,9 milhões, representando uma queda de 1,7%. Neste mesmo cenário, também é possível observar uma tendência de crescimento nas exportações brasileiras de soro de leite desde 2008. Em 2012 foi exportado o total de US\$ 55,4 milhões, contra US\$ 27,1 milhões em 2008. Por outro lado, apesar dessa produção, o Brasil continuou a importar uma quantidade considerável de soro. Em 2012 foi importado US\$ 46.783,2 milhões, o que equivale a uma variação positiva de 16,6% em relação a 2011 (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2013).

Segundo os dados acima, nota-se que o volume de soro é crescente, tanto em situações de exportação quanto importações. Por apresentar características poluentes, devido a sua Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) entre 30.000 e 60.000 mg de O₂ / L associado ao alto valor biológico de suas proteínas, o soro de leite pode ser interpretado como um problema para o meio ambiente, quando descartado de maneira errônea (PINTADO; MACEDO; MALEATA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; SINHA et al., 2007; CALDEIRA et al., 2010).

Estima-se que o soro, subproduto da fabricação de queijo, represente cerca de 80 a 90% do volume do leite original, fazendo parte de sua composição, lactose, cálcio, proteína e vitaminas hidrossolúveis, tornando-se um componente de grande valor agregado, com aplicações em indústrias, sendo elas, alimentícias, nutrição animal, bem como, indústrias de produções agrícolas (OLIVEIRA et al., 2006; SINHA et al., 2007).

3.2.1 Bebidas Lácteas Probióticas

Segundo a Instrução Normativa nº 16, de 23 de Agosto de 2005, preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, a bebida láctea é definida como “o produto lácteo resultante da mistura de leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos”. A base láctea deve representar pelo menos 51% m/m (massa/massa) do total de ingredientes do produto. Assim, é obrigatório conter nas bebidas lácteas, leite e soro, tendo como ingredientes opcionais produtos lácteos como o leitelho, caseinatos, entre outros, e não lácteos como frutas, cereais etc. (BRASIL, 2005).

Na indústria alimentícia, o soro é utilizado na fabricação de bebidas lácteas. O termo “bebidas lácteas” tem sentido amplo e é usado para nomear uma série de produtos fabricados com soro de leite (THAMER; PENNA, 2006).

Pesquisas realizadas pela GfK – Liquimetric, empresa que avalia a ingestão de bebidas não alcoólicas no país, apontam que o consumo de bebida láctea no Brasil chega a quase 50%, 46% no verão e 43% no inverno, ocupando a 4ª posição, com 12% do volume total de consumo. Esse estudo foi realizado por meio de preenchimento de diários contendo informações sobre a ingestão de líquidos em um total de 1.500 brasileiros entre um a 55 anos de idade, pertencentes às regiões de Belo Horizonte, Porto Alegre, Recife, Rio de Janeiro e São Paulo. Através deste, também foi possível mapear o perfil dos consumidores; com maior hábito de consumo durante a semana (67%), em casa (92%) e acompanhado por algum parente ou amigo (73%). As mulheres obtiveram um percentual maior de consumo quando comparadas aos homens, 56% e 44% respectivamente, e referente à faixa etária, as crianças entre um a 11 anos, consumiram em escala maior (47%) quando equiparadas aos demais. A pesquisa aponta ainda, que esse consumo pode ser vinculado aos cuidados com a saúde, satisfação gerada pelo sabor,

acompanhamento de refeições ou digestão de alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Por ter uma boa aceitação pelo público em geral e elevado valor nutritivo, a bebida láctea pode ser considerada como um potencial veículo para a incorporação de probióticos (ANTUNES et al., 2007). Nitidamente, nota-se a variedade de marcas, sabores e conceitos, distribuídos amplamente por todo o território. Segundo relatado por Heller (2001), os consumidores estão familiarizados com o fato de que alimentos fermentados podem apresentar micro-organismos vivos, viáveis. Esses micro-organismos podem ser adicionados como cultura única ou em conjunto com outras bactérias lácticas, durante ou após a fermentação, ou, ainda, ao produto fresco, antes de sua distribuição (ANJO, 2004; HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005).

Bebida láctea adicionadas de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *Streptococcus thermophilus*, foram avaliadas por Cunha et al. (2008), os autores observaram que de acordo com a legislação brasileira, essa bebida láctea armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ foi considerada probiótica por manter-se com uma população superior a 10^6 UFC/mL.

A viabilidade final entre as cepas utilizadas pôde ser analisada na pesquisa de Thamer e Penna (2005), durante a elaboração de uma bebida fermentada contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. associada a uma cultura *starter* (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) sob a adição de soro, açúcar e frutooligossacarídeos. As amostras pesquisadas armazenadas a 5°C atenderam ao exigido pela legislação brasileira, mantendo-se no mínimo em 10^6 UFC/mL, portanto, as formulações podem ser consideradas probióticas, devido à contagem dos micro-organismos *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus*.

Krüger et al. (2008), elaboraram uma bebida láctea probiótica sabor morango (utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja, e cultura *starter* *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), armazenada por 25 dias a 4°C . Os autores puderam observar a estabilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*, que se mantiveram em 10^6 UFC/mL.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo deva apresentar entre 10^8 e 10^9 UFC do probiótico utilizado, referente à quantidade de micro-organismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g ou mL de produto que contenha entre 10^6 e 10^7 UFC/g ou mL (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005), durante todo o prazo de validade.

A indústria de alimentos tem demonstrado um imenso interesse em desenvolver bebidas lácteas probióticas, utilizando cepas pré-selecionadas que se adaptem a essa matriz e assim consigam sobreviver às condições do produto fermentado, bem como, a passagem pelo trato gastrointestinal, seguido de adesão e colonização da mucosa intestinal, levando ao equilíbrio da microbiota intestinal em indivíduos que consomem diariamente esse produto, revertendo assim, em efeitos benéficos à saúde.

3.3 Mercado de Sobremesas Lácteas

O consumo de sobremesas lácteas tem aumentado nas últimas décadas, os ingredientes inovadores e os sistemas tecnológicos aplicados nas fábricas de laticínios têm proporcionado novas alternativas às sobremesas lácteas, permitindo a produção com novos sabores, com maior digestibilidade e maior valor nutritivo (NIKAEDO; AMARAL; PENNA, 2004). Embora a produção industrial de sobremesas lácteas seja delicada, podem ser adicionados chocolate, sucos ou polpas de fruta, micro-organismos probióticos, fibras e prebióticos (ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

O processo de fabricação é constituído basicamente das etapas de preparo da mistura, tratamento térmico, homogeneização, resfriamento parcial e estocagem sob-refrigeração. O tratamento térmico tem como objetivo prolongar a vida de prateleira das sobremesas lácteas por redução e destruição de micro-organismos, e também por inativação de enzimas (NIKAEDO; AMARAL; PENNA, 2004). Porém, conforme descrito por Nunes et al. (1998), trata-se de produtos complexos, cuja a estabilidade depende diretamente da tecnologia aplicada durante a produção, das

características intrínsecas de cada matriz e das condições de estocagem sob refrigeração.

O consumo de sobremesas lácteas no Brasil, corresponde a cerca de 3,2 quilos/ano, o que se difere da Argentina, onde o consumo é de 6,4 quilos/ano. Em 2013, no Brasil, esse tipo de alimento movimentou cerca de US\$ 70,2 milhões, atingindo seu máximo de vendas em Novembro, responsável por 9,9%, o que corresponde a uma movimentação de US\$ 6,9 milhões. Em 2007, esse mesmo mercado movimentou US\$ 48,9 milhões, com ápice de vendas também no mês de Novembro atingindo US\$ 4,3 milhões. Para 2014 e 2015, a estimativa é que esse mercado atinja US\$ 73,3 e US\$ 76,4 milhões, respectivamente (DATAMARK, 2013).

3.3.1 Sobremesas Lácteas Probióticas

Conforme descrito anteriormente, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo deva apresentar entre 10^8 e 10^9 UFC do probiótico utilizado, referente à quantidade de micro-organismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g ou mL de produto que contenha entre 10^6 e 10^7 UFC/g ou mL (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005), durante todo o prazo de validade.

As sobremesas lácteas são amplamente consumidas por distintos grupos de consumidores incluindo diversas faixas etárias. Cada vez mais a população mundial opta por alimentos práticos, de rápido e fácil consumo e que ao mesmo tempo sejam autorrecompensantes e benéficos. Entre esses alimentos, as sobremesas lácteas vêm ganhando destaque no cenário alimentar. Entretanto, após processamento, as sobremesas lácteas acrescidas de probióticos devem manter a viabilidade dos micro-organismos durante todo o período de consumo, bem como, não apresentar qualquer alteração sensorial.

O desenvolvimento de sobremesas lácteas contendo probióticos vem sendo estudado por vários pesquisadores (Helland, Whelland, Wicklund e Narvhus (2004) utilizaram cepas de *Lactobacillus acidophilus* La-5,

Bifidobacterium animalis Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 (1748) e *Lactobacillus rhamnosus* GG para a elaboração de pudins. Após 12 horas de fermentação e armazenamento em temperaturas de 4° a 6°C, os autores puderam observar que os micro-organismos probióticos atingiram de 10^8 a 10^9 UFC/g, mantendo assim a sua viabilidade. Na fabricação de uma mousse probiótica e simbiótica sabor chocolate, armazenada por 28 dias a 4°C, Aragon-Alegro et al. (2007) observaram que a sobrevivência do micro-organismo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* manteve-se viável com 10^7 UFC/g. No trabalho realizado por Buriti, Komatsu e Saad (2007), a atividade das polpas de maracujá e goiaba sobre *Lactobacillus acidophilus* em mousses refrigeradas por 21 dias a 4°C foram analisadas. A viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* diminuiu em até 4,7 log UFC/g no 21º dia nas mousses contendo maracujá, enquanto a população do probiótico permaneceu acima de 10^6 UFC/g naquelas contendo goiaba. Corrêa, Castro e Saad (2008) elaboraram um manjar branco, também conhecido como manjar de coco, contendo cepas de *Bifidobacterium lactis* BL-04 e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, os autores observaram que após 28 dias de armazenamento a 5°C, as cepas atingiram populações entre 10^6 e 10^7 UFC/g) podendo ser observado resultados favoráveis, quando relacionados a viabilidade das culturas em diversas matrizes. Por essa razão, tornaram-se uma atraente alternativa para a incorporação de ingredientes funcionais, como os probióticos (CARDARELLI et al., 2008). Podendo conferir aos consumidores, efeitos benéficos desejados.

4. ARTIGO

Bebida e sobremesas lácteas probióticas: viabilidade do *Lactobacillus casei* nos produtos e sua resistência em condições simuladas do trato gastrointestinal humano.

Probiotic milk drink and desserts: viability of *Lactobacillus casei* on products and their resistance in simulated human gastrointestinal tract conditions.

Fernanda Diekmann MANTOVANI¹; Angélica Romero Basso KIMURA²; Kawanna Cristina de LIMA³; Cínthia Hoch Batista de SOUZA⁴; Elsa Helena Walter de SANTANA⁵; Lina Casale ARAGON-ALEGRO^{6*}.

¹Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: fernandadiek@hotmail.com

²Discente do curso de Biomedicina da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

³Discente do curso de Biomedicina da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Doutora em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica (FCF/USP). Docente do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

⁵Doutora em Ciência Animal (UEL). Docente do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

⁶Doutora em Ciência dos Alimentos (USP). Docente do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência: Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados. Rua Marselha, 183, Jardim Piza, Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86041-100. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br

RESUMO

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas são capazes de conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. A administração correta e regular pode assegurar a prevenção de patologias, regulação da microbiota intestinal, redução de distúrbios do metabolismo gastrointestinal, inibição da carcinogênese e ação imunomoduladora. Porém, para que exerçam esses efeitos benéficos, os alimentos devem conter culturas probióticas viáveis, com populações acima de 10⁶ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g ou mL, durante todo período de validade do produto, além de sobreviverem à passagem pelo trato gastrointestinal. Desta maneira, objetivou-se avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* em bebida láctea sabor chocolate e flans de chocolate e maracujá, durante a vida de prateleira dos produtos, bem como a sua sobrevivência em condições de simulação do trato gastrointestinal. Para isso, após 1, 7, 14 e 21 dias da fabricação dos produtos lácteos, foram determinados o pH, a acidez e a viabilidade do micro-organismo probiótico *Lactobacillus casei* nos três produtos elaborados. Nos mesmos períodos, a viabilidade desse micro-organismo foi avaliada após passagem em caldos que simularam as condições do trato gastrointestinal (fase gástrica, primeira fase entérica e

segunda fase entérica). A fim de caracterizar os produtos elaborados, análises de composição centesimal foram realizadas após um dia da data de fabricação. Todo o experimento foi realizado em triplicata, e os dados avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o programa Statistica. O *Lactobacillus casei* manteve-se viável e em populações acima de 6 log UFC g ou mL nos três produtos avaliados, apresentando maiores populações na bebida láctea (7,89 UFC/mL). Quando submetido à simulação das condições gástricas, a população do *Lactobacillus casei* nos diferentes produtos apresentou redução entre 4 e 5 ciclos logarítmicos. A bebida láctea e o flan de maracujá apresentaram populações maiores (7,89 UFC/mL e 7,33 UFC/g, respectivamente) do *Lactobacillus casei* quando comparadas com o flan de chocolate (6,68 UFC/g). Apesar disso, o micro-organismo probiótico proveniente deste último, quando submetido às condições entéricas, recuperou-se mais rapidamente que os presentes nos outros produtos.

Palavras-chave: Flan. Probiótico. Estômago. Intestino delgado. Intestino grosso.

ABSTRACT

Probiotics are living micro-organisms capable of producing beneficial effects on their host when consumed in adequate amounts. Proper and regular administration can ensure for prevention of pathologies, regulation of intestinal microflora, gastrointestinal metabolism disorders, immunomodulatory and inhibition of carcinogenesis. However, to exert these beneficial effects, food must contain viable probiotic cultures with populations above 10^6 Colony Forming Units (CFU) / mL or g throughout the period of validity of the product as well as survive the passage through the gastrointestinal tract. This research proposed the development of a chocolate flan, a passion fruit flan and a chocolate flavored milk drink, all probiotics. For this purpose, the next day of the the dairy products manufacture and after 7, 14 and 21 days, the pH, acidity and viability of probiotic micro-organism *Lactobacillus casei* in the three products were determined. In the same periods, the viability of this micro-organism was evaluated after passage in broth that simulated the conditions of the gastrointestinal tract (gastric phase, first enteric phase and second enteric phase). In order to characterize the products produced after a day of the date of manufacture an analyzes of chemical composition were conducted. The entire experiment was performed in triplicate and the data were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, using the Statistica program. The *Lactobacillus casei* remained viable in populations above 6 log CFU g or mL in the three product were determined, with higher populations in milk drink (7,89 UFC/mL). When subjected to simulated gastric conditions, the population of *Lactobacillus casei* in the different products decreased between 4 and 5 log cycles. A milk drink and passion fruit flan had higher populations (7,89 UFC/mL e 7,33 UFC/g, respective) of *Lactobacillus casei* compared with the chocolate flan (6,68 UFC/g). However, the probiotic microorganism from the latter, when subjected to enteric conditions, recovered faster than those present in other products.

Key-words: Flan. Probiotics. Stomach. Small intestine. Large intestine.

4.1 INTRODUÇÃO

Na última década, a preocupação com a alimentação saudável, aliada à diversidade de tecnologias na área de alimentos, fez com que diversos produtos com propriedades funcionais fossem elaborados, visando ao mesmo tempo saúde e bem estar (OLIVEIRA et al., 2002; SAAD et al., 2011).

A utilização de culturas probióticas, principalmente em leite e derivados, ganhou destaque, com o lançamento, no mercado, de uma série de produtos funcionais (GOMES; MALCATA, 1999). Por ter uma boa aceitação pelo público em geral e elevado valor nutritivo, a bebida láctea pode ser considerada como um potencial veículo para a incorporação de probióticos (ANTUNES et al., 2007). Nitidamente, nota-se a variedade de marcas, sabores e conceitos, distribuídos amplamente por todo o território. Segundo relatado por Heller (2001), os consumidores estão familiarizados com o fato de que alimentos fermentados podem apresentar micro-organismos vivos, viáveis e cada vez mais a população mundial opta por alimentos práticos, de rápido e fácil consumo e que ao mesmo tempo sejam autorrecompensantes e benéficos. Entre esses alimentos, as sobremesas lácteas também vêm ganhando destaque no cenário alimentar.

Diversas definições foram publicadas nas duas últimas décadas com o intuito de conceituar probióticos (SANDERS, 2003). Entretanto, a atual e internacionalmente aceita é a que considera probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Dentre os quais: além do controle da microbiota intestinal, há outros como: estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção dos ácidos acético e lático, de bacteriocinas; promoção da

digestão de lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006). *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os gêneros bacterianos mais utilizados em alimentos lácteos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; JIM; MARQUART; ZHAO, 2000; ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001).

O modo exato de ação dos probióticos e seus efeitos, ainda são incertos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). De acordo com Sleator e Hill (2009), bacteriocinas produzidas por micro-organismos probióticos podem destruir patógenos invasores, através da lise de suas células; células probióticas podem mimetizar receptores de superfície, impedindo a adesão do patógeno à membrana celular do hospedeiro; micro-organismos probióticos podem neutralizar toxinas produzidas por micro-organismos patogênicos, no organismo humano.

Gareau, Sherman e Walker (2010) afirmam que os probióticos podem agir de diferentes maneiras, como: bloqueando a adesão e a penetração de patógenos nas células epiteliais, posicionando-se como uma barreira física; estimulando as células caliciformes presentes no intestino a produzirem muco, criando uma barreira; aumentando a integridade entre as células, impedindo a passagem das substâncias produzidas por patógenos através do epitélio; produzindo substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio; estimulando o sistema imunológico inato, sinalizando as células dendríticas, que migram em direção aos linfonodos mesentéricos e induzem as células T a produzirem citocinas anti-inflamatórias.

Porém, para que esses efeitos benéficos ocasionados pelo consumo de probióticos ocorram, alguns critérios de seleção para a incorporação à matriz devem ser respeitados e criteriosamente acompanhados, como: indicações de segurança; gênero de origem humana; não patogênicos; estabilidade frente ao ácido, pepsina, bile e enzimas pancreáticas; capacidade de aderir-se e colonizar a mucosa intestinal; capacidade de produzir compostos antimicrobianos; ser metabolicamente ativo no intestino; não apresentar genes determinantes de resistência aos antibióticos. Além disso, os probióticos devem

sobreviver às condições de processamento e armazenamento do alimento (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000).

No entanto, as bactérias probióticas somente apresentarão efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem um número mínimo estipulado. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo apresente entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do probiótico utilizado, referente à quantidade de micro-organismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g ou mL de produto que contenha entre 10^6 e 10^7 UFC/g ou mL (HAULY et al., 2005), durante todo o prazo de validade.

Assim, a cultura a ser empregada deve apresentar uma propriedade fundamental que se refere a sua viabilidade durante o processamento do alimento e em sua passagem pelo trato gastrointestinal, (GILLILAND, 1979). Porém, a viabilidade das bactérias probióticas pode ser comprometida pelo processo de fabricação do produto, pelas condições físicas de armazenamento (tempo, temperatura), pela composição química do produto no qual os micro-organismos serão adicionados, pelas possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas *starter* (SHAH; RAVULA, 2000; HELLER, 2001). Além disso, o micro-organismo probiótico utilizado deve sobreviver à ação do ácido, pepsina, bile e enzimas pancreáticas, para que assim possa estar viável durante a passagem pelo trato gastrointestinal, aderir-se e colonizar à mucosa intestinal e exercer algum tipo de efeito benéfico sobre a saúde do consumidor (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000).

Assim, neste trabalho, pretendeu-se verificar a viabilidade de *Lactobacillus casei* em bebida láctea fermentada sabor chocolate e derivados lácteos não fermentados, como flan de chocolate e de maracujá, durante a vida-de-prateleira dos produtos, bem como avaliar sua sobrevivência em condições que simularam a passagem pelo trato gastrointestinal. Além disso, avaliaram-se a influência da fermentação e do sabor na população de *Lactobacillus casei* nas distintas matrizes (sólida e líquida).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento dos produtos e as análises foram realizados no Laboratório do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, em Londrina – PR. Os experimentos foram repetidos três vezes e todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1 Matérias-primas

Para a produção dos flans utilizou-se leite UHT desnatado (Batavo, Teutônia, Brasil), leite em pó desnatado (Molico/Nestlé, Araçatuba, Brasil), creme de leite com 25% de gordura (Nestlé, Araçatuba, Brasil), gelatina em pó sem sabor (Oetker, Nazário, Brasil), açúcar refinado (Barra, Sertãozinho, Brasil), chocolate em pó (Nestlé, Araçatuba, Brasil), suco de maracujá (Maguary, Aracati, Brasil), goma xantana (Cargill, Mairinque, Brasil) e cultura probiótica *Lactobacillus casei* (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

Para a produção da bebida láctea foram utilizados leite UHT integral (Batavo, Teutônia, Brasil), soro de leite em pó (Confepar, Londrina, Brasil), cultura *starter* mista composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIXTM 496 LYO 100 DCU Danisco, Dangé, França), cultura probiótica *Lactobacillus casei* (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca), açúcar refinado (Barra, Sertãozinho, Brasil) e chocolate em pó (Nestlé, Araçatuba, Brasil).

4.2.2 Produção dos Flans

Os ingredientes que foram utilizados para a produção dos flans e suas respectivas quantidades são apresentados na Tabela 1. Após a pesagem, estes foram misturados, com exceção da goma xantana, gelatina e do micro-organismo probiótico, e aquecidos a 80 – 85°C, em banho-maria, por aproximadamente 30 minutos. Após resfriamento a 40°C, em banho de gelo, com agitação contínua (Batedeira Philips Walita 300W – MOD.RI 7115, Eindhoven, Holanda) adicionou-se o micro-organismo probiótico *Lactobacillus*

casei. A mistura foi homogeneizada e a goma xantana e a gelatina, adicionadas. O flan foi homogeneizado utilizando-se batedeira (Philips Walita 300W – MOD.RI 7115, Eindhoven, Holanda), até ter atingida a temperatura de 14°C. O produto obtido foi embalado individualmente, em copos plásticos com tampa, pré-higienizados, contendo, aproximadamente 35 g de flan cada um.

TABELA 1 - Ingredientes e respectivas quantidades utilizadas na produção dos flans sabor chocolate e maracujá, ambos probióticos (*Lactobacillus casei*).

Ingrediente	Flan de chocolate	Flan de maracujá
	Quantidade (%)	Quantidade (%)
Leite UHT desnatado	46,98	46,98
Creme de leite	28,18	28,18
Leite em pó desnatado	1,88	1,88
Gelatina em pó sem sabor	1,13	1,13
Açúcar	14,09	14,09
Chocolate em pó	7,52	-
Suco de maracujá	-	7,52
Goma xantana	0,02	0,02
Cultura probiótica	0,20	0,20

Fonte: Dados do autor.

4.2.3 Produção das Bebidas Lácteas

Foram elaboradas bebidas lácteas sabor chocolate, utilizando 70% de leite integral padronizado (3% de gordura) pasteurizado adicionado de 30% de soro de leite em pó. A mistura foi aquecida a 90°C por 5 min, resfriada em banho de gelo a 43°C, adicionada da cultura *starter* mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, além da cultura probiótica *Lactobacillus casei* (0,2%). Em seguida, a mistura foi homogeneizada manualmente utilizando-se bastão de vidro e levada à estufa BOD a 42°C. Após ter atingido pH entre 4,6 e 4,8, a mistura foi resfriada a 6°C para a quebra do coágulo, de forma mecânica (bastão de vidro), durante 30 s, seguida da adição dos demais ingredientes (7% de chocolate em pó e 14% de açúcar). As

bebidas lácteas foram então envasadas em garrafas plásticas pré-higienizadas, com capacidade para 500 mL, contendo 100 mL da bebida em cada uma.

4.2.4 Armazenamento e Período de Amostragem

Os flans e a bebida láctea foram armazenados sob-refrigeração a 4°C até o momento das análises. Para a bebida láctea sabor chocolate foram realizadas análises de enumeração do micro-organismo probiótico *Lactobacillus casei* e das culturas starter *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, e nos flans (chocolate e maracujá) foi realizada a enumeração do micro-organismo probiótico *Lactobacillus casei*.

As enumerações dos micro-organismos, acidez e pH foram realizados após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. A avaliação *in vitro* da resistência da cultura probiótica às condições gástrica e entéricas simuladas realizaram-se nos mesmos períodos. A composição centesimal dos diferentes produtos foi realizada no dia seguinte à produção dos mesmos.

4.2.5 Análises Físico-Químicas

O pH foi avaliado utilizando-se pHmetro (TECNAL TEC5, Piracicaba, Brasil). A composição centesimal foi determinada utilizando-se os métodos oficiais da AOAC (2003). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl, e o teor de proteína calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total por 6,38. O teor de lipídeos foi determinado pelo método modificado de Mojonier, o teor de cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla e teor de sólidos totais através de secagem em estufa. O teor de carboidratos foi calculado por diferença, ou seja, para resultados em base seca, teor de carboidratos (%) = 100 – (% lipídeos + % proteínas + % cinzas). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.6 Enumeração dos Micro-organismos nos Produtos

Alíquotas de 10 g de amostra foram transferidas para bolsas de amostragem esterilizadas, onde foram adicionados 90 mL de solução salina

(0,85% p/v). A partir desta diluição, foram efetuadas diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente.

A enumeração de *Streptococcus thermophilus*, nas bebidas lácteas, foi realizada semeando-se as diluições decimais em ágar M17, e as colônias foram contadas após dois dias de incubação a 37°C, em aerobiose (LIMA et al., 2009). *Lactobacillus bulgaricus* foi enumerado semeando-se as diluições decimais em ágar MRS acidificado com ácido acético (até atingir pH de 5,4), e as colônias foram contadas após três dias de incubação a 37°C em anaerobiose (LIMA et al., 2009). *Lactobacillus casei* foi enumerado semeando-se as diluições em ágar MRS + 1% de solução de sorbitol a 10%, e as colônias foram contadas após três dias de incubação a 37°C em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid) (RAVULA; SHAH, 1998).

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de flan ou por mL de bebida láctea. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.7 Avaliação *in vitro* da Resistência da Cultura Probiótica às Condições Gástrica e Entéricas Simuladas Durante o Armazenamento dos Produtos Sob Refrigeração (4°C)

A análise foi conduzida, empregando-se um modelo *in vitro*, utilizando-se sucos gástrico e entéricos simulados, bem como enzimas do trato gastrointestinal (TGI), adaptado de Souza (2010), conforme descrito a seguir.

Os valores de pH de cada etapa do teste foram ajustados: fase gástrica (pH 2,0), primeira fase entérica (pH 5,0) e segunda fase entérica (pH 7,0), de acordo com Chateris et al. (1998); Lian, Hsiao e Chou (2003); Noriega et al. (2004); Collado e Sanz (2007).

Decorridos os tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado (4°C) das amostras, porções de 10 g dos produtos contendo as culturas probióticas foram homogeneizadas com 90 mL de solução salina (0,85% p/v). As amostras, então, foram submetidas à análise de resistência às condições gástrica e entérica simuladas.

Para a realização dos ensaios de resistência *in vitro*, foram preparados 9 frascos Schott de 100 mL, para cada alimento testado (bebida

láctea sabor chocolate, flan de maracujá e flan de chocolate). Em um primeiro momento, adicionou-se uma alíquota de 10 mL da diluição homogeneizada da bebida láctea em todos os frascos, além de soluções das enzimas pepsina (Pepsin from porcine stomach mucosa, Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, EUA, 0,1 mL – 3,0 g/L) e lipase (Amino lipase from *Penicillium camemberti*, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, EUA, 0,01 mL - 1,30 mg/L lipase), também dissolvidas em NaCl 0,5% e 0,25 mL de HCl 1N, totalizando um conteúdo de 10,36 mL. As mesmas concentrações foram utilizadas para o flan de chocolate e flan de maracujá. Os frascos foram incubados a 37°C por 2 h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m em Shaker (TECNAL TE420, Piracicaba, Brasil). Essa primeira etapa do ensaio *in vitro* correspondeu à fase gástrica. Após esse período, três frascos foram retirados para análise da população de *Lactobacillus casei*.

Para a simulação da bebida láctea correspondente a primeira etapa entérica (intestino delgado), os seis frascos restantes foram adicionados de 1,50 mL de solução de fosfato de sódio pH 12 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 14 g; NaOH 1N, 150 mL; H_2O destilada q.s.p., 1 L) contendo bile (Bile bovine, Sigma-Aldrich, 5 g/L) e pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich, 1,6 g/L), totalizando um conteúdo de 11,86 mL. As mesmas concentrações foram utilizadas para o flan de maracujá e, para o flan de chocolate, utilizou-se 1,25 mL, desta solução de fosfato de sódio com bile e pancreatina, totalizando 11,61 mL. As amostras foram reincubadas a 37°C por 2 h, com agitação de aproximadamente 150 r.p.m. Ao final da primeira etapa entérica, mais três frascos foram retirados para análise da população de *Lactobacillus casei*.

Após 4 h de experimento, iniciou-se a segunda etapa entérica (intestino grosso), na qual uma alíquota de 1,50 mL de solução de fosfato de sódio pH 12, contendo bile (7,95 g/L) e pancreatina (0,79 g/L) foi adicionada aos três frascos restantes contendo o produto bebida láctea, totalizando um volume final de 13,36 mL. Os volumes adicionados aos frascos de análise dos flans de chocolate e maracujá foram de 1,25 e 1,75 mL, totalizando 12,86 mL e 13,61 mL, respectivamente. Os frascos, então, incubados novamente a 37°C, por mais 2 h, sob agitação de aproximadamente 150 r.p.m., totalizando 6 horas de ensaio.

A retirada das alíquotas de cada Schott, referente às etapas gástrica e entérica, contendo os produtos lácteos e os sucos gástrico e entérico simulados, ocorreu após 2 h, 4 h e 6 h do início do ensaio *in vitro*. Os valores de pH de cada amostra em cada etapa do ensaio foram monitorados, utilizando-se pHmetro (TECNAL TEC5, Piracicaba, Brasil).

Para a enumeração dos *Lactobacillus casei* sobreviventes ao ensaio *in vitro*, alíquotas de 1 mL provenientes dos sucos gástrico e entérico simulados foram submetidas a sucessivas diluições em solução salina estéril (0,85% p/v) e semeadas em placas contendo ágar MRS + 1% de solução de sorbitol a 10%. As colônias foram contadas após três dias de incubação a 37°C em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid) (RAVULA; SHAH, 1998).

4.2.8 Análise Estatística

Para se avaliar os dados microbiológicos e físico-químicos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o programa Statistica (STATSOFT, 2000).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Composição centesimal

A fim de se caracterizar os produtos, foi realizada a composição centesimal dos mesmos. Os valores de umidade, proteínas, carboidratos, gordura e cinzas são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Composição centesimal média, em porcentagem, da bebida láctea sabor chocolate e dos flans de chocolate e maracujá, todos probióticos (*Lactobacillus casei*).

Composição (%)	Flan de chocolate	Flan de maracujá	Bebida láctea de chocolate
Gordura	8,34	7,04	2,72
Cinzas	1,14	0,82	0,88
Proteína	6,13	6,57	3,48
Umidade	65,25	75,41	80,04
EST	34,76	24,59	19,95
Carboidratos	19,15	10,16	12,87

EST = Extrato seco total.

Fonte: Dados do autor.

A adição de creme de leite contendo 25% de gordura foi responsável pela maior concentração de gordura nos flans, quando comparados com a bebida láctea. Em relação aos dois sabores de flan, o de chocolate apresentou maior quantidade de gordura, o que é justificado pela adição do chocolate em pó, que apresenta 7,5% de gorduras totais em sua composição (Tabela 2).

A concentração de proteínas na bebida láctea foi quase metade das observadas nos flans (Tabela 2), provavelmente devido ao soro adicionado à bebida.

Em relação à umidade, observa-se na Tabela 2 que a bebida foi a que apresentou maiores valores, seguida pelo flan de maracujá e, por último, pelo flan de chocolate. Neste último, foram adicionados menos ingredientes líquidos que nos demais produtos. O flan de chocolate apresentou maiores concentrações de carboidratos que o flan de maracujá e a bebida láctea.

4.3.2 pH

Os valores de pH durante a simulação das condições do trato gastrointestinal foram semelhantes durante o tempo e para os três produtos,

uma vez que o objetivo, durante estas análises, foi manter o pH do estômago próximo de 2,0, do intestino delgado, próximo de 5,0, e do intestino grosso, de 7,0.

O valores de pH observados nos produtos elaborados foram, em média, 4,83, 6,71 e 5,53, para a bebida láctea, o flan de chocolate e o flan de maracujá, respectivamente.

O comportamento do pH nos produtos durante os 21 dias de armazenamento a 4°C pode ser observado na Figura 1.

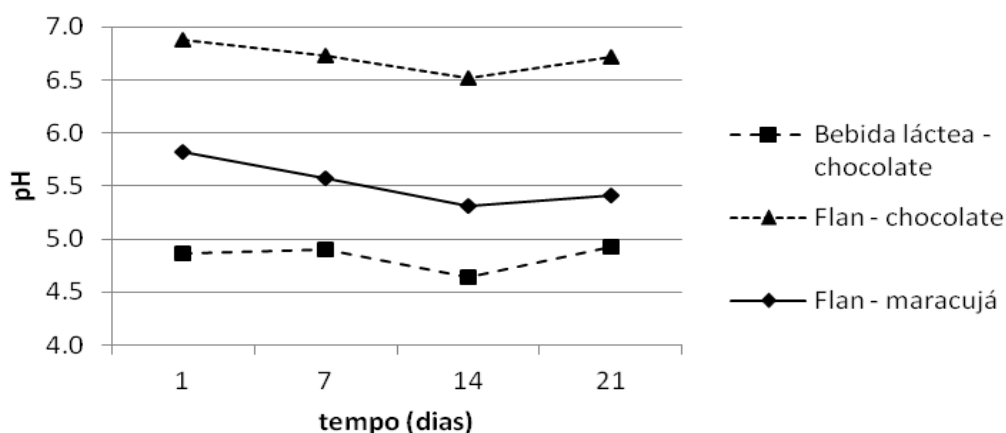


FIGURA 1. Valores médios de pH observados na bebida láctea sabor chocolate e nos flans de chocolate e maracujá, durante os 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C).

A bebida láctea foi o produto que apresentou menores valores de pH durante os 21 dias, não tendo sido verificada diferença nos valores entre os dias de análise ($p > 0,05$) (Figura 1). Segundo Tamime e Robinson (1991) e Kessler (1981), estes valores mais baixos devem-se à produção de ácidos orgânicos pelas culturas *starter*, como os ácidos láctico (58,9%), cítrico (28,1%), acético (5,3%), fórmico (2,4%) e succínico (2,3%).

Outros autores também elaboraram bebidas lácteas e avaliaram seus valores de pH durante o armazenamento. Thamer e Penna (2006) produziram bebidas lácteas funcionais fermentadas por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus* e acrescidas de prebiótico, e verificaram que os valores de pH variaram entre 4,72 e 4,83. Krüger et al. (2008) desenvolveram uma bebida láctea sabor

morango probiótica, utilizando soro de leite e extrato de soja e verificaram que os valores de pH dos produtos diminuiram durante o armazenamento, variando de 4,98 para 4,35, no 19º dia.

O pH do flan de maracujá foi menor que o observado no flan de chocolate, em todos os momentos de análise, demonstrando que este parâmetro foi influenciado pela acidez do maracujá. Valores semelhantes aos observados neste trabalho foram encontrados por Henrique et al. (2012), que desenvolveram sobremesas lácteas com diferentes variedades de maracujá e verificaram pH variando entre 5,12 e 5,85.

Buriti, Komatsu e Saad (2007) elaboraram mousses de maracujá e de goiaba e verificaram que as sobremesas que continham maracujá apresentaram valores de pH inferiores (entre 4,94 e 5,03) quando comparadas a mousse contendo goiaba (6,05).

No presente trabalho, o pH dos flans de chocolate variaram entre 6,51 e 6,88. Mousses de chocolate probiótico e simbiótico foram elaborados por Aragon-Alegro et al. (2007). Os autores verificaram valores de pH menores que neste trabalho, variando entre 5,67 e 6,26 para os produtos probióticos e entre 5,37 e 6,21 para os simbióticos.

Nikaedo, Amaral e Penna (2004) produziram sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar e verificaram que os valores de pH variaram entre 7,15 e 5,77, nas diferentes formulações.

Além disso, as empresas têm comercializado fermentos lácticos compostos por baixas populações de *Lactobacillus bulgaricus*, comparadas às de *Streptococcus thermophilus*, a fim de se minimizar o problema da pós-acidificação excessiva do produto durante sua vida-de-prateleira. Esta medida pode ter influenciado na ausência de pós acidificação verificada nas bebidas lácteas produzidas neste trabalho, uma vez que os valores de pH destes produtos mantiveram-se constantes durante o armazenamento (Figura 1).

4.3.3 População das culturas *starter* na bebida láctea

A população total de bactérias lácticas presentes na bebida láctea apresentou-se sempre acima de 8 log UFC/mL. Esses valores estão de acordo

com a legislação brasileira, que exige que a contagem total de bactérias lácticas viáveis nos leites fermentados deva ser, no mínimo, de 6 log UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2007).

As populações das culturas *starter Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* presentes na bebida láctea sabor chocolate durante os 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C), mantiveram-se com valores médios de 5,97 e 8,94 log UFC/ mL, respectivamente ($p>0,05$), demonstrando predominância de *Streptococcus thermophilus* em comparação a *Lactobacillus bulgaricus*. Esses dados corroboram com os observados por Oliveira e Damin (2003) e Thamer e Penna (2005). Segundo Dave e Shah (1998) e Vinderola e Reinheimer (2000), quando se utiliza culturas mistas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, o primeiro predomina sob todas as condições utilizadas.

4.3.4 População de *Lactobacillus casei*

As populações médias de *Lactobacillus casei* (log UFC/ mL ou g) na bebida láctea e nos flans estão apresentadas na Tabela 3, onde se observa, também, as populações deste probiótico após passagem por caldos simulando as condições do estômago, intestino delgado e intestino grosso.

Lactobacillus casei manteve-se viável (não houve diferença estatística significativa) nos produtos durante os 21 dias de armazenamento ($p>0,05$), apresentando valores médios de 7,89, 6,68 e 7,33 log UFC/mL para a bebida láctea, o flan de chocolate e o flan de maracujá, respectivamente. Apesar desta diferença, o número total de probióticos existente na bebida e nos flans excedeu o mínimo necessário para que eles sejam considerados alimentos probióticos, de 10^6 UFC/mL ou g, atendendo a legislação em vigor (BRASIL, 2008).

TABELA 3. Populações médias de *Lactobacillus casei* na bebida láctea (UFC/mL) e flans (UFC/g), durante 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C) e após a simulação das condições do trato gastrointestinal humano.

Amostra	Dia de análise	Bebida láctea chocolate	Flan chocolate	Flan maracujá
Alimento	1	7,88	6,79	7,19
	7	7,84	6,74	7,56
	14	7,92	6,71	7,57
	21	7,92	6,49	6,97
Estômago	1	3,28	2,37	2,72
	7	2,26	3,03	2,63
	14	3,32	2,29	3,38
	21	2,96	2,53	3,58
Intestino Delgado	1	3,33	5,15	3,39
	7	3,06	5,90	3,35
	14	3,42	3,81	3,65
	21	3,33	2,65	3,36
Intestino Grosso	1	3,48	5,24	3,52
	7	2,79	5,74	4,24
	14	3,60	3,04	3,92
	21	3,48	4,41	3,83

Fonte: Dados do autor

As populações de *Lactobacillus casei* nos produtos lácteos produzidos, em todos os dias de análise, sofreram redução estatisticamente significativa quando foram submetidas às condições gástricas simuladas ($p < 0,05$) (Tabela 3). Esta redução foi, em média, de 4,94 log UFC/mL para a bebida láctea, 4,13 log UFC/g para o flan de chocolate e 4,25 log UFC/g para o flan de maracujá. Além disso, nesta fase das análises, verificaram-se sempre as menores populações de *Lactobacillus casei*, principalmente devido aos valores de pH próximos a 2,0.

Na bebida láctea não foi verificada diferença entre as populações de *Lactobacillus casei* observadas após simulação do estômago, em relação à observada após simulação dos intestinos delgado e grosso ($p > 0,05$) (Tabela 3), demonstrando que o pH mais alto (7,0) do intestino grosso não auxiliou na recuperação do micro-organismo probiótico. Esta redução após a simulação

das condições do trato gastrointestinal humano ocorreu devido à ação do ácido, da pepsina, bile e enzimas pancreáticas.

Quando se submeteu o flan de chocolate armazenado durante 21 dias sob refrigeração às condições simuladas do trato gastrointestinal humano, verificou-se que as populações do probiótico recuperaram-se significativamente ao serem submetidas ao pH mais alto do intestino grosso, observando-se um aumento de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos ($p < 0,05$), aumento de 1,29 log UFC/g entre estômago e intestino delgado e de 1,71 log UFC/g entre estômago e intestino grosso. Isto não foi verificado nos outros produtos. Provavelmente, o pH mais baixo do flan de maracujá e da bebida láctea, além da presença das culturas *starter* nesta última podem ter contribuído para o estresse de *Lactobacillus casei* no produto. Assim, como este micro-organismo já se encontrava sob essas condições, o ambiente simulado do estômago parece ter contribuído para uma demora maior no tempo de recuperação de *Lactobacillus casei*.

Comparando-se as populações de *Lactobacillus casei* na bebida láctea e no flan de chocolate, verificou-se que o produto fermentado apresentou maiores populações deste micro-organismo, demonstrando que o processo fermentativo e/ ou a presença das culturas *starter* podem ter estimulado a multiplicação dos probióticos. Porém, após a simulação das condições gástricas, *Lactobacillus casei* proveniente da bebida láctea recuperou-se mais lentamente.

Além disso, neste trabalho, verificou-se o contrário do relatado por Saad et al. (2011), que afirmam que a matriz sólida permite uma maior proteção aos micro-organismos, em relação à matriz líquida.

As populações de *Lactobacillus casei* do flan de chocolate e da bebida láctea observadas após passagem pelas condições simuladas do trato gastrointestinal não diferiram entre si nos diferentes dias de análise, com exceção do dia 7, em que as populações do probióticos foram sempre maiores no flan de chocolate do que na bebida ($p < 0,05$).

As populações de *Lactobacillus casei* foram maiores no flan de maracujá, quando comparadas às presentes no flan de chocolate. Vinderola et al. (2002) observaram que a cepa de *Lactobacillus acidophilus* CNRZ 1881 teve sua multiplicação afetada por sucos de morango, abacaxi e kiwi, porém

essa viabilidade não foi reduzida quando o pH dos sucos foi neutralizado. Provavelmente, o pH do flan de maracujá não foi tão baixo a ponto de inibir a multiplicação de *Lactobacillus casei*.

Buriti, Komatsu e Saad (2007) avaliaram mousses probióticos adicionados de suco ou polpa de maracujá e polpa de goiaba. Eles verificaram que a adição de maracujá, na forma de suco ou polpa inibiu a multiplicação de *Lactobacillus acidophilus* La-5.

4.4 CONCLUSÃO

Lactobacillus casei manteve-se viável e em populações acima de 6 log UFC/g ou mL nos três produtos avaliados, apresentando maiores populações na bebida láctea. Quando submetido à simulação das condições gástricas, a população de *Lactobacillus casei* nos diferentes produtos apresentou redução entre 4 e 5 ciclos logarítmicos.

A bebida láctea e o flan de maracujá apresentaram populações superiores de *Lactobacillus casei* quando comparadas com o flan de chocolate. Apesar disso, o micro-organismo probiótico proveniente deste último, quando submetido às condições entéricas, recuperou-se mais rapidamente que os presentes nos outros produtos.

4.5 REFERÊNCIAS

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, n.2, p.145-154, jun. 2004.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT- Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, maio 2007.

ARES, G.; GIMÉNEZ, A.; GÁMBARO, A. Consumer perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts: influence of ingredient name and health claim. **Food Quality and Preference**, v.20, n.1, p.50-56, jan. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES – ABIAD. **Mercado de alimentos funcionais cresce no mundo.** Disponível em: <<http://www.abiad.org.br/index.php/component/search/?searchword=consumo+d e+alimento&ordering=&searchphrase=all>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis.** 17th ed. Washington, DC: AOAC, 2003.

BONNAIRE, L.; SANDRA, S.; HELGASON, T.; DECKER, E.A.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D.J. Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.56, n.10, p.3791-3797, abr. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos:** lista das alegações aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 25 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 16, de 23 de agosto de 2005.** Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial da União, Brasília, 24 ago. 2005. Seção 1, Página 7. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12792>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheese. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.228-235, jan. 2007.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2-3, p.121-129, fev. 2010.

CALDEIRA, L.A.; FERRÃO, S.P.B., FERNANDES, S.A.A.; MAGNAVIT, A.P.A.; SANTOS, T.D.R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2193-2198, out. 2010.

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.1, p.51-55, mar. 2007.

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1037-1046, jul. 2008.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.5, p.759-768, jun. 1998.

COLLADO, M.C.; SANZ, Y. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.4, p.1147-1157, out. 2007.

CORRÊA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potencial and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.9, p.1560-1568, set. 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Conjuntura do mercado lácteo**. Minas Gerais, 2013. 16p. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_Com%C3%A9rcio%20Internacional_Leite.pdf>. Acesso em: 10 març. 2013.

FERREIRA, C.L.L. Grupo de bactérias lácticas e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L. **Prebióticos e probióticos** atualização e prospecção. 1.ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2012. p.9-22.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2012.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Bebidas lácteas são consumidas por quase metade dos brasileiros**. São Paulo, 2011. 13p. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/162.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, maio 1989.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biociotecnologia Alimentar**, n.64, p.12-22, ago. 1999.

HAULY M.C.O; FUCHS, R.H.B; PRUDENCIO-FERREIRA S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, n.5, p.613-622, set./out. 2005.

GUERIN-DANAN, C.; CHABANET, C.; PEDONE, C.; POPOT, F.; VAISSADE, P.; BOULEY, C.; SZYTT, O.; ANDRIEUX, C. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, n.1, p.111-117, jan. 1998.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v.14, n.11, p.957-965, nov. 2004.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.374s-379s, ago. 2001.

HUDAULT, S.; LIÉVIN, V.; BERNET-CAMARD, M.F.; SERVIN, A.L. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.2, p.513-518, fev. 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Brasileiro nasce com expectativa de vida de 74,6 anos**. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.brasil/noticia/2013/12/brasileiro-nasce-com-expectativa-de-vida-de-746-anos-aponta-ibge.html>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, jul./set. 2008.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. 2.ed. New York: Wiley, 1999. 211p.

LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n.3, p.293-301, set. 2003.

LIMA, K.G.C.; KRUGER, M.F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT- Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.491-495, març. 2009.

LISERRE, A.M.; RÉ, M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v.21, n.1, p.1-16, fev. 2007.

MUN, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. **Food Research International**, v.40, n.6, p.770-781, jul. 2007.

NIKAEDO, P.H.L.; AMARAL, F.F.; PENNA, A.L.B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragenas e guar. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.3, p.397-404, jul./set. 2004.

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; SÁNCHEZ, B.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILA, C.G. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.1, p.79-86, jul. 2004.

NUNES, M.C.; MURATA, L.T.F.; ALCÂNTARA, M.R.S.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Avaliação das sobremesas lácteas: características que podem comprometer a garantia de qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.41-48, 1998.

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

OLIVEIRA, V.M.; CORTEZ, M.A.S.; FREITAS, M.Q.; FRANCO, R.M. Avaliação sensorial de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecidas com ferro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.13, n.2, p.67-70, maio/ago. 2006.

PINTADO, M.E.; MACEDO, A.C.; MALEATA, F.X. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science Technology International**, v.7, n.2, p.105-116, abr. 2001.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurth and fermented milk drinks. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.12, n.11, p.819-22, nov. 1998.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2493s-2502s, jul. 2007.

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURITI, F.C.A. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I. **Probióticos e prebióticos em alimentos** fundamentos e aplicações tecnológicas. 1.ed. São Paulo: Varela, 2011. p.23-26.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, jan./març. 2006.

SALLANS, F.; RODRIGUEZ, F.; SABLAYROLLES, B.; COMBES, A.; PATAU, J.P.; ROUFFIAC, R. Etude comparative de cinq specialties de théophylline a liberation prolongée. **Journal de Pharmacie Belgique**, v.43, p.81-87, 1988.

SALVATIERRA, M.; MOLINA, A.; GAMBOA, M.M.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto de cultivos prebióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.54, n.3, p.298-302, jun. 2004.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v.61, n.3, p.91-99, març. 2003.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p.139-144, 2000.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formalation. **Food Chemistry**, v.101, n.4, p.1484-1491, 2007.

SLEATOR, R.D.; HILL, C. Rational design of improved pharmabiotics. **Journal of Biomedical Biotechnology**, v.2009, n.2009, p.87-2752, set. 2009.

SOUZA, C.H.B. **Desenvolvimento de margarina probiótica e simbiótica: viabilidade do probiótico no produto e resistência in vitro**. 2010. 208 fls. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2010.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.589-595, jul./set. 2006.

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. **Internacional Dairy Journal**, v.12, n.7, p.579-589, 2002.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Internacional Dairy Journal**, v.8, n.5-6, p.473-479, maio 1998.

5 CONCLUSÃO

Lactobacillus casei manteve-se viável e em populações acima de 6 log UFC/g ou mL nos três produtos avaliados, apresentando maiores populações na bebida láctea. Quando submetido à simulação das condições gástricas, a população de *Lactobacillus casei* nos diferentes produtos apresentou redução entre 4 e 5 ciclos logarítmicos.

A bebida láctea e o flan de maracujá apresentaram populações superiores de *Lactobacillus casei* quando comparadas com o flan de chocolate. Apesar disso, o micro-organismo probiótico proveniente deste último, quando submetido às condições entéricas, recuperou-se mais rapidamente que os presentes nos outros produtos.

6 REFERÊNCIAS

ALVAREZ-OLMOS, M.I.; OBERHELMAN, R.A. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.11, p.1567-1576, out. 2001.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, n.2, p.145-154, jun. 2004.

ANTUNES, A.E.C.; MARASCA, E.T.G.; MORENO I.; DOURADO, F.M.; RODRIGUES, L.G.; LERAYER, A.L S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.83-90, jan./mar. 2007.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT- Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, maio 2007.

ARES, G.; GIMÉNEZ, A.; GÁMBARO, A. Consumer perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts: influence of ingredient name and health claim. **Food Quality and Preference**, v.20, n.1, p.50-56, jan. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES – ABIAD. **Mercado de alimentos funcionais cresce no mundo**. Disponível em: <<http://www.abiad.org.br/index.php/component/search/?searchword=consumo+d+e+alimento&ordering=&searchphrase=all>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista das alegações aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 25 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 16, de 23 de agosto de 2005**. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial da União, Brasília, 24 ago. 2005. Seção 1, Página 7. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12792>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheese. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.228-235, jan. 2007.

BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.315-317, abr./jun. 2007.

CALDEIRA, L.A.; FERRÃO, S.P.B., FERNANDES, S.A.A.; MAGNAVIT, A.P.A.; SANTOS, T.D.R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2193-2198, out. 2010.

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.1, p.51-55, mar. 2007.

CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1037-1046, jul. 2008.

COLLADO, M.C.; SANZ, Y. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.4, p.1147-1157, out. 2007.

CORRÊA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potencial and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, n.9, p.1560-1568, set. 2008.

CUNHA, T.M.; CASTRO, F.P.; BARRETO, P.L.M.; BENEDET, H.D.; PRUDÊNCIO, E.S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea fermentada adicionadas de probióticos. **Semina**, v.29, n.1, p.103-116, jan./mar. 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Conjuntura do mercado lácteo**. Minas Gerais, 2013. 16p. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_Com%C3%A9rcio%20Internacional_Leite.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2013.

FARIA, C.P.; BENEDET, H.D.; GUERROUE, J.L.L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.511-516, mar. 2006.

FERREIRA, C.L.L. Grupo de bactérias lácticas e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012. p.9-22.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2012.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Bebidas lácteas são consumidas por quase metade dos brasileiros.** São Paulo, 2011. 13p. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/162.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, maio 1989.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar**, v.101, n.64, p.12-22, ago. 1999.

GUARNER, F. Composition of the human enteric microbiota. In: GUARNER, F. **The enteric microbiota: colloquium series on integrates systems physiology from molecule to function to disease.** Mississippi: Morgan&Claypool life sciences, 2011. p.23-31.

GUERIN-DANAN, C.; CHABANET, C.; PEDONE, C.; POPOT, F.; VAISSADE, P.; BOULEY, C.; SZYTT, O.; ANDRIEUX, C. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, n.1, p.111-117, jan. 1998.

HAULY M.C.O; FUCHS, R.H.B; PRUDENCIO-FERREIRA S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, n.5, p.613-622, set./out. 2005.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v.14, n.11, p.957-965, nov. 2004.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.374s-379s, ago. 2001.

HIRSCH, B.I.; HIRSCH, J.G. Metchnikoff's life and scientific contributions in historical perspective. In: KARNOSKY, M.L.; BOLIS, L. **Phagocytosis: past and future.** London: Academic press, 1982. p.1-11.

HUDAULT, S.; LIÉVIN, V.; BERNET-CAMARD, M.F.; SERVIN, A.L. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.2, p.513-518, fev. 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Brasileiro nasce com expectativa de vida de 74,6 anos**. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.brasil/noticia/2013/12/brasileiro-nasce-com-expectativa-de-vida-de-746-anos-aponta-ibge.html>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, jul./set. 2008.

KRÜGER, R.; KEMPKA, A.P.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R.L.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p.43-53, jan./mar. 2008.

LAGERKVIST, U. Elie Metchnikoff. In: LAGERKVIST, U. **Pioneers of microbiology and the nobel prize**. Singapore: World scientific, 2003. p.125-136.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth – promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, n.3659, p.747-748, fev. 1965.

MENEZES, C.R.; BARIN, J.S.; CHICOSKI, A.J.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1309-1316, jul. 2013.

NIKAEDO, P.H.L.; AMARAL, F.F.; PENNA, A.L.B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragenas e guar. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.3, p.397-404, jul./set. 2004.

NUNES, M.C.; MURATA, L.T.F.; ALCÂNTARA, M.R.S.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Avaliação das sobremesas lácteas: características que podem comprometer a garantia de qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.41-48, 1998.

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

OLIVEIRA, V.M.; CORTEZ, M.A.S.; FREITAS, M.Q.; FRANCO, R.M. Avaliação sensorial de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecidas com ferro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.13, n.2, p.67-70, maio/ago. 2006.

PINTADO, M.E.; MACEDO, A.C.; MALEATA, F.X. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science Technology International**, v.7, n.2, p.105-116, abr. 2001.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2493s-2502s, jul. 2007.

ROCHET, V.; RIGOTTIER-GOIS, L.; SUTREN, M.; KREMENTSCKI, M.N.; ANDRIEUX, C.; FURET, J.P.; TAILLIEZ, P.; LEVENEZ, F.; MOGENET, A.; BRESSON, J.L.; MÉANCE, S.; CAYUELA, C.; LEPLINGARD, A.; DORÉ, J. Effects of orally administered *Lactobacillus casei* DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. **British Journal of Nutrition**, v.95, n.2, p.421-429, fev. 2006.

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURITI, F.C.A. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011. p.23-26.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, jan./mar. 2006.

SALVATIERRA, M.; MOLINA, A.; GAMBOA, M.M.; ARIAS, M.L. Evaluación del efecto de cultivos prebióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.54, n.3, p.298-302, jun. 2004.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v.61, n.3, p.91-99, mar. 2003.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p.139-144, 2000.

SILVA, A.S.; HONJOYA, E.R.; INAY, O.M.; COSTA, M.R.; SOUZA, C.H.B.; SANTANA, E.H.W.; SUGUIMOTO, H.H.; ARAGON-ALEGRO, L.C. Viability of *Lactobacillus casei* in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. **Semina**, v.33, n.6Supl2, p.3163-3170, 2012.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v.101, n.4, p.1484-1491, 2007.

SLEATOR, R.D.; HILL, C. Rational design of improved probiotics. **Journal of Biomedical Biotechnology**, v.2009, p.7, set. 2009.

TAN, S.Y.; DEE, M.K. Élie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. **Singapore Medical Journal**, v.50, n.5, p.456-457, maio 2009.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.589-595, jul./set. 2006.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.3, p. 393-400, jul./set. 2005.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Internacional Dairy Journal**, v.8, n.5-6, p.473-479, maio 1998.