

**UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Leites fermentados ou cultivados contendo *Bifidobacterium*:
enumeração seletiva das culturas probióticas e bioajustadoras**

Lívia Pinto Heckert Bastos

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**LEITES FERMENTADOS OU CULTIVADOS CONTENDO
BIFIDOBACTERIUM: ENUMERAÇÃO SELETIVA DAS CULTURAS
PROBIÓTICAS E BIOAJUSTADORAS**

LÍVIA PINTO HECKERT BASTOS

Sob a orientação de
Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação e Ciências e Tecnologia de Alimentos Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica-RJ
Julho de 2015

637.146

Bastos, Livia Pinto Heckert, 1987-

B3271

T

Leites fermentados ou cultivados contendo Bifidobacterium: enumeração seletiva das culturas probióticas e bioajustadoras / Livia Pinto Heckert Bastos. - 2015.

72 f.: il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f.46-60.

1. Leite fermentado - Teses. 2. Lactobacilo - Teses. 3. Probióticos - Teses. I. Luchese, Rosa Helena, 1957- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha mãe Lucia Helena, meu maior amor, ao meu irmão Lucas Bastos, a minha tia Ângela Esméria e ao meu pai Eber Bastos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por iluminar meu caminho, e por me aproximar da minha avó Maria da Glória no seu último ano de vida.

À minha família, principalmente à minha mãe, minha grande incentivadora, meu grande amor.

Ao meu pai e irmão, pelo companheirismo, incentivo e carinho.

À minha tia madrinha Ângela Esméria, pelo acolhimento, e sempre disposta a ajudar.

Aos meus primos, Miguel Ataíde, Diana Costa e Simone Costa, por estarem presentes em minha vida, e contribuírem com minha vida acadêmica desde o seu início.

A colaboradora Cristiane dos Santos, pelo apoio, e por preparar minhas refeições.

À minha orientadora Prof. PhD Rosa Helena Luchese, pelos ensinamentos e atenção que sempre teve comigo, e pelo carinho.

Ao amigo André Guerra, pela orientação e paciência.

Aos amigos Roberto Laureano e Ivan Bianco, pela amizade, carinho, e ajuda em todas as etapas do trabalho.

Aos amigos de pós graduação Gabriela Viana e Leandro Cappato, pela contribuição e amizade

À Edlene, Ediná Rodrigues e Valéria, pela grande ajuda prática prestada a este trabalho.

À amiga Anália Barbosa, pela compreensão e amor desde a infância.

As amigas Vanessa Bosi e Camila Marques, pela torcida para que esse trabalho fosse concluído com êxito.

As amigas Clarissa Kopke e Tatiana Flister, pelas boas risadas nos momentos difíceis.

À minha grande amiga, Joana Pereira, pela amizade, e por estar presente em minha vida, sempre disposta a ajudar.

As amigas de mestrado, Natália Lima e Jéssica Costa pelo companheirismo

Ao meu namorado, Júnior pela compreensão e amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

BASTOS, Livia Pinto Heckert. **Leites fermentados ou cultivados contendo *bifidobacterium*: enumeração seletiva das culturas probióticas e bioajustadoras.** 2015.60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Dentre os diversos gêneros de microrganismos com propriedades probióticas destacam-se as espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Em algumas condições, as bifidobactérias utilizadas na elaboração dos produtos lácteos perdem a viabilidade antes do final da vida útil dos produtos devido a diferentes condições tais como a exposição ao ácido (durante ou após sua fermentação) e o contato com oxigênio durante a distribuição e estocagem refrigerada, chegando ao consumidor em número insuficiente para exercer a sua ação probiótica. Além disso, podem ser adicionadas culturas bioajustadoras (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) na elaboração de leites fermentados em conjunto com os microrganismos probióticos, as quais trazem benefícios tecnológicos, mas não possuem atividade probiótica. Tais microrganismos podem mascarar um resultado de contagem de microrganismos viáveis probióticos, quando a enumeração for não seletiva. O objetivo geral dessa pesquisa foi quantificar seletivamente células de *Bifidobacterium* sp. viáveis utilizando diluente pre-reduzido em leites fermentados comerciais, assim como de culturas bioajustadoras. Para quantificar a cultura probiótica foi necessário realizar uma avaliação de três meios de cultura quanto a produtividade para *Bifidobacterium* e seletividade para as culturas bioajustadoras através do método ecométrico. Foram coletados leites fermentados de três diferentes marcas sabor morango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, contendo *Bifidobacterium* sp. Os leites fermentados foram analisados conforme período de fabricação, faixa I: até 20 dias após fabricação e faixa II: de 21 a 45 dias de fabricação. Quando disponível foi feita análise do leite fermentado integral e desnatado. Foi realizada também uma comparação na contagem da cultura probiótica na utilização de dois diluentes: água peptonada a 0,1% e água peptonada pré-reduzida. Foi possível concluir que o meio de cultura MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos foi eficaz para o isolamento de *Bifidobacterium* sp em leites fermentados. O experimento foi realizado em triplicata utilizando-se como diluente a água peptonada pré-reduzida. Não foram observadas diferenças significativas na contagem das culturas probióticas e bioajustadoras em relação a data de pós fabricação e o teor de gordura presente nos leites fermentados. Verificou-se a adequação da rotulagem e a concordância dos resultados da contagem de *Bifidobacterium* sp, quanto aos valores exigidos pela legislação. De acordo com método estatístico de ANOVA, ocorreu um efeito significativo do tipo de diluente na contagem *Bifidobacterium* sp. em amostras de leite fermentados da faixa I, mas não foram verificadas diferenças significativas das marcas de leites fermentados e da interação entre as variáveis experimentais. Todas as marcas em diferentes faixas de fabricação mantiverem os valores mínimos na contagem probiótica em conformidade com a legislação para leites fermentados probióticos.

Palavras - chave: probióticos, *bifidobacterium*, leite fermentado.

ABSTRACT

BASTOS, Livia Pinto Heckert. Fermented or cultured milk containing bifidobacterium: selective enumeration of probiotic cultures and starters. 2015.60p. Dissertation (MSc in Food Science and Technology).Institute of Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

Probiotics are defined as live microorganisms that when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. Among the several genera of microorganisms with probiotic properties there are the species of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. In some conditions, the bifidobacteria used in the preparation of dairy products lose viability before the end of the useful life of the products due to conditions such as exposure to acid (during or after their fermentation) and contact with oxygen during distribution and storage refrigerated, reaching the consumer with insufficient quantity to exercise their probiotic action. In addition, starter cultures can be added (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) in the preparation of fermented milks in conjunction with probiotic microorganisms, which bring technological benefits but do not possess probiotic activity. Such microorganisms can mask a result of viable probiotic microorganism count when the enumeration is not selective. The overall objective of this research was to quantify selectively *Bifidobacterium* sp viable cells in fermented commercial milks as well as bio adjusted cultures. To quantify the probiotic culture were necessary to conduct an assessment of three cultures as productivity for *Bifidobacterium* and selectivity for bio adjusted cultures through ecometric method. Fermented milks were collected from three different strawberry flavor brands sold in the city of Rio de Janeiro, containing *Bifidobacterium* sp. Fermented milks were analyzed according to the period of production, group I: up to 20 days after manufacturing and group II 21-45 days of manufacture. When available, were also analyzed full fermented milk and skim. A comparison was also carried out in the probiotic count the use of two solvents: 0.1% peptone water and pre-reduced peptone water. It was concluded that the MRS culture medium and added cysteine was supplemented with antibiotics effective for the isolation of *Bifidobacterium* sp in fermented milks. The experiment was performed in triplicate using as diluent pre-reduced peptone water. No significant differences were observed in the counts of probiotic cultures and starters regarding the date of manufacture and post this fat content in the milk fermented. It was verified the adequacy of labeling and the agreement of the results of the counts of *Bifidobacterium* sp, as the values required by legislation. According to statistical method ANOVA, there was a significant effect of diluent on the type *Bifidobacterium* sp count in fermented milk samples of group I, but significant differences in brands of fermented milks and the interaction between the experimental variables have not been verified. All brands in different manufacturing groups maintain the minimum values in the probiotic count in accordance with the rules for probiotic fermented milks.

Key - words: probiotics, *bifidobacterium* sp, fermented milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Relação simbiótica entre as culturas lácticas (<i>S.thermophilus</i> e <i>L.bulgaricus</i>) durante a fermentação em leites fermentados e iogurtes	18
Figura 2.	Fluxograma do Processo de Produção do leite fermentado probiótico.	20
Figura 3.	Esquema de inoculação pelo método ecométrico	25
Figura 4.	Câmara de anaerobiose com temperatura a 36°C	25
Figura 5.	Água peptonada pré-reduzida pronta para ser utilizada	27
Figura 6:	Espalhamento da alíquota no meio de cultura seletivo para <i>Bifidobacterium</i>	27
Figura 7.	Meio de cultura Àgar MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos (A), Àgar <i>Reinforced Differential Clostridial Medium</i> (RDCM) contendo azul da prússia (B) e BIM-25 (C) com crescimento da cultura <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>lactis</i> (SACCO).	30
Figura 8.	Colônias de <i>Bifidobacterium</i> sp. isoladas da amostra de leite fermentado da marca C pertencente a faixa I. Crescimento das colônias no meio de cultura MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos.	32
Figura 9.	Médias e erro padrão das contagens de <i>Bifidobacterium</i> sp. em leites fermentados das marcas A, B e C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II). A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira (BRASIL, 2002).	33
Figura 10.	Colônias de <i>S. thermophilus</i> no meio de cultura M17, isolados da marca B da amostra de leite fermentado (Faixa II), primeira diluição (10^{-1}).	35
Figura 11.	Média e erro padrão das contagens de <i>S. thermophilus</i> nos leites fermentados dos fabricantes A, B e C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II).	35
Figura 12.	Colônias de <i>Lactobacillus</i> sp. no meio de cultura LAMVAB, nas diluições de 10^{-1} a 10^{-4}	37
Figura 13.	Média e erro padrão na contagem de <i>Lactobacillus</i> sp. na amostra de leite fermentado da marca C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II).	37
Figura 14.	Colônias de <i>Bifidobacterium</i> nas placas com meio de cultura MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos nas diluição decimal de 10^{-1} com diluente água peptonada (D) e água peptonada pré-reduzida (E).	38
Figura 15.	Influência da pré-redução do diluente na recuperação de bifidobacterias nos leites fermentados da faixa I. A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira. * representa $P < 0,05$ quando comparado à condição controle.	39
Figura 16.	Gráfico da avaliação do diluente água peptonada pré-reduzida na contagem de <i>Bifidobacterium</i> sp. em amostras de leite fermentado da faixa II. A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira. * representa $p < 0,05$ quando comparado à condição controle.	40
Figura 17.	Médias e erro padrão das contagens de <i>Bifidobacterium</i> sp. em leite fermentado desnatado e integral do fabricante A com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II). A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira (BRASIL, 2002).	41

- Figura 18.** Médias e erro padrão das contagens de *S.thermophilus* em leite fermentado desnatado e integral do fabricante A com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II). 42
- Figura 19.** Fotomicrografia de *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* e *Streptococcus* isolados da amostra de leite fermentado marca A por microscopia óptica (1000x). 42

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Ensaio clínicos publicados (2004 a 2008), sobre a eficácia da suplementação de probióticos no tratamento e/ou prevenção das doenças alérgicas	9
Tabela 2. Índice de Crescimento Absoluto (ICA) em diferentes meios das culturas de <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	30
Tabela 3. Avaliação da utilização de água peptonada pré-reduzida na contagem de <i>Bifidobacterium</i> sp. em três marcas de leites fermentados da Faixa I.	38
Tabela 4. Avaliação da utilização de água peptonada pré-reduzida na contagem de <i>Bifidobacterium</i> sp. em três marcas de leites fermentados da Faixa II	39
Quadro 1. Diretrizes para utilização das alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde em alimentos segundo ANVISA	5
Quadro 2. Lista de microrganismos com atividades probióticas	6
Quadro 3. Espécies de bifidobactérias isoladas de humanos e espécies utilizadas em produtos comerciais	11
Quadro 4. Definição dos leites fermentados de acordo com a cultura <i>starter</i> utilizada na fermentação	16
Quadro 5. Descreve os reagentes e suas quantidades (mg) para o preparo de 100mL da solução antimicrobiana	24
Quadro 6. Descrição do preparo das soluções para elaboração da água peptonada pré-reduzida	26
Quadro 7. Descrição dos reagentes, as quantidades e os procedimentos usados para preparo das soluções A, B e C	28

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

FOSHU	<i>Food for Specific Health Use;</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations;</i>
WHO	<i>World Health Organization;</i>
UFC	Unidade formadora de colônia;
FDA	<i>Food and Drug Administration;</i>
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade;
IgA	Imunoglobulina A;
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus;</i>
NNLP	Ácido nalidíxico, cloreto de lítio, sulfato de paromomicina;
FOS	Frutoligossacarídeos;
GOS	Galactoligossacarídeos;
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada;
IDF	Federação Internacional de Laticínios;
ISO	<i>International Organization for Standardization;</i>
BAL	Bactérias ácido lácticos;
IN	Instrução Normativa;
CODEX	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
µm	Micrometro
µl	Microlitro
ICA	Índice de Crescimento Absoluto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Alimentos funcionais	4
3.1.1 Legislação pertinente a alimentos funcionais	4
3.1.2 Consumo dos alimentos funcionais	5
3.2 Probióticos	6
3.2.1 Mercado de produtos probióticos	6
3.2.2 Características dos probióticos	7
3.2.3 Mecanismos de ação dos probióticos	7
3.2.4 Benefícios dos alimentos probióticos	7
3.2.4.1 Ação dos probióticos na modulação da resposta imunológica	8
3.2.4.2 Intolerância a Lactose	8
3.2.4.3 Síndrome do Intestino Irritável	8
3.2.4.4 Doenças Alérgicas	8
3.2.4.5 Contribuição dos probióticos no desempenho de atletas	10
3.3 <i>Bifidobacterium</i>	10
3.3.1 <i>Bifidobacterium</i> em produtos lácteos	11
3.3.2 Meios de cultura utilizados para isolamento de <i>Bifidobacterium</i>	12
3.4 Matriz Alimentar x Viabilidade de culturas probióticas	13
3.5 Rotulagem para alimentos probióticos	14
3.6 Leites Fermentados	15
3.6.1 Leite fermentado Probiótico	16
3.6.2 Culturas bioajustadoras ou “ <i>starter</i> ”	16
3.6.2.1 <i>Streptococcus thermophilus</i>	17
3.6.2.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	17
3.6.2.3 Relação simbiótica entre <i>S.thermophilus</i> e <i>L.bulgaricus</i>	18
3.6.3 Elaboração de Leite fermentado probiótico	19
3.7 Desafios tecnológicos na produção de alimentos lácteos probióticos	21
3.8 Legislação para Leites Fermentados	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Amostras de Leites Fermentados	23
4.2 Microrganismos	23
4.2.1 Composição dos Meios de Cultura Seletivos para <i>Bifidobacterium</i>	23

4.2.1.1	Ágar MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos seletivo para <i>Bifidobacterium</i>	23
4.2.1.2.	Meio reforçado diferencial para Clostrídios (RDCM) adicionado de azul da Prússia	24
4.2.1.3	Meio BIM-25	24
4.3	Seleção de Meio de Cultura para Enumeração de <i>Bifidobacterium</i>	24
4.3.1	Avaliação dos meios de cultura pelo método ecométrico	24
4.4	Diluentes Utilizados para Validação da Metodologia para Quantificação do número de <i>Bifidobacterium</i> sob estresse em Leites Fermentados	26
4.4.1	Água peptonada a 0,1%	26
4.4.2	Água peptonada pré-reduzida	26
4.5	Contagem de Bifidobactérias e Culturas Bioajustadoras de pH em Leites Fermentados Comerciais	26
4.5.1	Enumeração de bifidobactérias nas amostras de leite fermentado	26
4.5.2	Enumeração de culturas bioajustadoras de pH em leites fermentados	27
4.5.2.1	<i>Composição dos meios de cultura seletivos para Streptococcus thermophilus e Lactobacillus.</i>	27
4.6	Confirmação da Identidade das Culturas <i>Bifidobacterium</i> sp. e Bioajustadoras	28
4.7	Conformidade dos Rótulos das Amostras de Leites Fermentados Comerciais Analisadas de Acordo com as Legislações de Rotulagem	28
4.8	Análise Estatística	29
	5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1.	Seleção de meio de cultura para enumeração de <i>Bifidobacterium</i>	30
5.2.	Contagem de Bifidobactérias e Culturas Bioajustadoras de pH em Leites Fermentados Comerciais	32
5.2.1.	Influência do tempo de fabricação dos Leites Fermentados na Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> sp.	32
5.2.2.	Influência do tempo de fabricação dos Leites Fermentados na Viabilidade de <i>S.thermophilus</i>	35
5.2.3.	Influência do tempo de fabricação dos Leites Fermentados na Viabilidade de <i>Lactobacillus</i> sp.	36
5.3.	Influência da pré-redução do diluente na Recuperação de <i>Bifidobacterium</i> sp. nos Leites Fermentados	38
5.3.1	Comparação dos diluentes na contagem de <i>Bifidobacterium</i> sp. em três marcas de leite fermentado da FAIXA I	38
5.3.2	Comparação dos diluentes na contagem de <i>Bifidobacterium</i> sp. em três marcas de leite fermentado da FAIXA II	39
5.3.3.	Influência do Teor de Gordura do Leite Fermentado na Recuperação de <i>Bifidobacterium</i> sp. e cultura bioajustadora <i>S. thermophilus</i> .	40
5.4.	Confirmação das colônias de <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>S.thermophilus</i> através do método de coloração de Gram	42
5.5.	Avaliação da rotulagem das marcas de leites fermentados sabor morango comerciais analisadas	43
	6 CONCLUSÃO	45
	7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O termo Alimentos Funcionais surgiu no Japão por volta dos anos 80 em programa de governo, com o objetivo de desenvolver alimentos saudáveis para melhorar a saúde da população e reduzir gastos com doenças evitáveis a partir de uma alimentação adequada. Naquela época, a definição de alimento funcional, adotada pela legislação de alimentos japonesa foi: “Alimento Destinado a uso Específico de Saúde” (*Food for Specific Health Use-FOSHU*) (SILVEIRA et al, 2009).

Nos últimos anos a preocupação com o bem-estar e com a saúde tem aumentado a procura por consumidores de produtos com alegações funcionais consequência ao fato vem ocorrendo maior desenvolvimento da indústria nessa área. O aumento no consumo desses produtos deve-se a esses possuírem potencial benéfico à saúde através do uso de mecanismos não previstos na nutrição convencional. Tais produtos vem sendo alvo de pesquisas científicas, mas deve ser ressaltado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças.

No Brasil as informações referentes aos alimentos com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde são regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia especial vinculada ao Ministério da Saúde, criada em 1999 pela Lei nº 9.782 (BRASIL, 1999a).

No mesmo ano de sua criação a ANVISA publicou duas resoluções relacionadas a esses alimentos (nº18 e 19). A resolução nº18 aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos e a resolução nº 19 aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro desses alimentos (BRASIL, 1999d; BRASIL,1999e).

Os alimentos funcionais podem ser classificados quanto aos componentes bioativos presentes como: probióticos, prebióticos, fitoquímicos, vitaminas e minerais essenciais, peptídeos bioativos (BRASIL, 2008).

Os probióticos são um importante grupo de alimentos funcionais, os produtos lácteos, especialmente os leites fermentados, pertencem a categoria de alimentos no mercado com maior número de produtos probióticos. Esses só podem receber a denominação “Probiótico” se possuírem culturas com propriedades funcionais reconhecidas. Os gêneros mais utilizados são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (FAO/WHO, 2001).

Diversos estudos demonstram os benefícios à saúde atribuídos ao uso de probióticos, dentre os quais podemos destacar: o controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a substância, estimulação do sistema imune, alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (principalmente as vitaminas do complexo B), efeito antioxidante e redução nos níveis de triglicérides séricos (GAGGIA et al, 2010; SPYROPOULOS et al, 2011; BERTAZZONI et al, 2013; SAAD et al, 2013; FLOCH, 2014; VANDENPLAS et al, 2015).

Segundo a legislação sanitária, para que os alimentos probióticos exerçam benefícios à saúde, devem conter de 10^8 a 10^9 UFC/g (unidades formadoras de colônia/grama) de culturas probióticas adicionadas (BRASIL, 2008). Para leites fermentados é permitida uma porção diária mínima de 10^6 UFC/g se a cultura utilizada for *Bifidobacterium* sp. (BRASIL, 2007).

Em muitos casos são utilizadas culturas bioajustadoras ou *starters* em conjunto com bactérias probióticas na produção de leites fermentados, com objetivo de melhorar as características tecnológicas como textura e sabor.

As culturas bioajustadoras mais utilizadas são *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, essas permitem a fermentação em tempo reduzido (aproximadamente duas vezes menor) ao utilizado nas culturas probióticas originais, tornando-se essa condição adequada para a indústria.

São escassas as informações a respeito do número real viável de bifidobactérias em leites fermentados comerciais brasileiros, sendo assim torna-se importante realizar essa contagem e compará-la com a quantidade mínima exigida pela legislação. Diante da preocupação com a qualidade desses produtos e a necessidade da avaliação da concordância desses com a legislação nacional, esse trabalho teve como objetivo quantificar os microrganismos *Bifidobacterium* sp., *S. thermophilus* e *Lactobacillus* sp. em amostras de leites fermentados comerciais avaliando a sua conformidade com a legislação vigente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a viabilidade das *Bifidobacterium* sp. como cultura probiótica, presentes em leites fermentados comerciais.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar três meios de cultura quanto a produtividade para bifidobactérias e a seletividade a culturas bioajustadoras, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*.
2. Quantificar as culturas probióticas de *Bifidobacterium* sp. em três marcas de leites cultivados ou fermentados sabor morango.
3. Avaliar o efeito da utilização de diluente pré-reduzido na recuperação de *Bifidobacterium* sp presente nos leites fermentados probióticos.
4. Quantificar as culturas *S.thermophilus* e *Lactobacillus* sp. em leites fermentados
5. Verificar a adequação da rotulagem.
6. Avaliar a concordância dos resultados das contagens de *Bifidobacterium* sp, quanto aos valores exigidos pela legislação.
7. Avaliar o efeito do teor de gordura do leite fermentado no crescimento de *Bifidobacterium* sp.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Alimentos Funcionais

O primeiro país a elaborar e regulamentar o processo de formulação para alimentos funcionais foi o Japão. O princípio foi rapidamente adotado mundialmente e as denominações das alegações, bem como os critérios para sua aprovação variam de acordo com a regulamentação de cada país (STRINGHETA et al, 2007; SILVEIRA et al, 2009).

Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*) alimento funcional é qualquer alimento modificado que possa fornecer um benefício a saúde além dos nutrientes presentes (NOONAN; NOONAN, 2004). Um alimento pode ser considerado como funcional, se este demonstrar satisfatoriamente um ou mais efeitos benéficos sobre funções alvo no organismo do consumidor, além de um adequado efeito nutricional (ROBERFROID, 2002; FDA, 2004; STRINGHETA et al, 2007).

3.1.1 Legislação pertinente a alimentos funcionais

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da ANVISA, regulamentou os Alimentos Funcionais através das resoluções: ANVISA 16/99; ANVISA 17/99 e ANVISA 19/99.

a) Resolução 16/99 – Estabelece procedimentos para registro de alimentos e ou novos Ingredientes sem padrão de identidade e qualidade (PIQ), além de permitir o registro de novos produtos sem histórico de consumo no país e novas formas de comercialização para produtos já consumidos (BRASIL, 1999b); b) Resolução 17/99 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança de Alimentos baseado em estudos e evidências científicas sobre a segurança do produto à saúde (BRASIL, 1999c); c) Resolução 18/99 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999d); d) Resolução 19/99 - Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde na Rotulagem (BRASIL, 1999e).

As principais diretrizes brasileiras para a utilização da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em alimentos de acordo com a ANVISA, encontram-se descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Diretrizes para utilização das alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde em alimentos segundo a ANVISA.

Utilização da alegação de Propriedades funcionais e/ou de saúde em alimentos
Permitida em caráter opcional.
Além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, podem produzir efeitos metabólicos e/ ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.
Permitidas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia.
No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para avaliação de Risco e Segurança dos alimentos.
Permitidas as referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução de risco de doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças

Fonte: (BRASIL, 1999d; BRASIL, 1999e).

3.1.2 Consumo dos alimentos funcionais

O consumo de alimentos funcionais é determinado por uma multiplicidade de fatores entre esses: busca de solução a problemas primários de saúde, familiaridade com o conceito de produtos e ingredientes funcionais e assimilação da comunicação dos produtos como promotores de efeitos benéficos a saúde (VERBEKE, 2005; SIRO et al, 2008; ANNUNZIATA;VECCHIO, 2011).

As alegações de saúde desempenham um papel central na orientação e decisões na compra de produtos funcionais. Além das características sensoriais que segundo Urala; Lähteenmäki (2007), é um fator que influencia na aceitação desses produtos, alguns estudos têm relatado a conscientização do consumidor por uma alimentação adequada e inclusão de produtos promotores de saúde (BECH-LARSEN; GRUNERT, 2003; MOSKOWITZ; BECKLEY ; MINKUS-MCKENNA, 2004; VAN KLEEF et al, 2005; VERBEKE, 2005), e as motivações que levam ao consumo desses produtos (NIVA; MAKELA, 2007; KRYSTALLIS et al, 2008).

Estudo realizado por Annunziata;Vecchio (2013), revelou que os consumidores ainda estão equivocados em relação a definição e benefícios dos produtos com alegação funcional e possuem dificuldades na escolha dos diferentes tipos de produtos disponíveis no mercado, sendo possível consequência ao fato a excessiva propaganda dos seus fabricantes (VERBEKE, 2005; URALA ; LÄHTEENMÄKI, 2007; COX et al, 2010).

Alguns autores demonstraram que dentre os alimentos funcionais os probióticos, principalmente os iogurtes e leites fermentados, destacam-se na preferência entre os consumidores (VAN KLEEF et al, 2005; HAILU et al, 2009; ANNUNZIATA ; VECCHIO, 2013).

3.2 Probióticos

Os primeiros relatos de que o consumo de microrganismos influenciavam a saúde humana foram sugeridos por Metchnikoff em 1907. O pesquisador observou que camponeses da Bulgária, que consumiam leites fermentados, apresentavam maior longevidade. Metchnikoff relatou a proteção contra infecções gastrintestinais relacionadas ao consumo de grandes quantidades de leite fermentado por bactérias produtoras de ácido láctico.

O termo probiótico é derivado do grego e significa “para a vida”, esse foi utilizado pela primeira vez por Lilly; Stillwell (1965), que denominaram as substâncias secretadas por um protozoário que estimulava o crescimento de outros. Parker (1974), definiu como suplementos e/ou substâncias alimentares destinados a animais - incluindo microrganismos - que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal. Fuller (1992), considerou probióticos suplementos alimentares que contêm bactérias vivas produtoras de efeitos benéficos ao hospedeiro (COPPOLA; TURNES, 2004; DENIPOTE et al, 2010).

A legislação brasileira define os probióticos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002b). Ainda de acordo com a legislação, existem 10 diferentes espécies de microrganismos probióticos nomeados na Quadro 2 (BRASIL, 2008).

Quadro 2: Lista de microrganismos com atividades probióticas

<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei shirota</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>defensis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: (BRASIL, 2008)

As bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas comercialmente, pois possuem um longo histórico na produção de derivados lácteos e são encontrados predominantemente no intestino humano grosso (*Bifidobacterium*) e delgado (*Lactobacillus*) (TRIPATHI; GIRI, 2014).

3.2.1 Mercado de produtos probióticos

O mercado global de alimentos e bebidas probióticas cresceu de 33 bilhões de dólares no ano de 2000 para cerca de 177 bilhões em 2013. O avanço nesse setor foi responsável por 5% do crescimento mundial na indústria alimentícia (GRANATO et al, 2010; HENNESSY, 2013). Estima-se que os alimentos probióticos compreendem entre 60% e 70% do total do mercado de alimentos funcionais (KOLOZYN - KRAJEWSKAA; DOLATOLATOWSKI, 2012).

Desde os anos 80 as culturas probióticas que predominam no mercado são *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei shirota* e *Bifidobacterium animalis lactis* (BB12) (SAAD et al, 2013; SYBESMA et al, 2015).

3.2.2 Características dos probióticos

Para que sejam consideradas culturas probióticas algumas características específicas deverão ser seguidas: serem originárias do trato intestinal do hospedeiro; biologicamente seguras; reproduzirem-se rapidamente; produzirem substâncias antimicrobianas; serem resistentes ao tempo entre a fabricação, comercialização e ingestão do produto resistindo à acidez gástrica e a bile e mantendo-se viáveis no intestino humano (FAO/WHO, 2002; SANDERS, 2008; COOK et al, 2012).

As linhagens de bactérias são classificadas como probióticas quando atenderem os seguintes critérios específicos: a) não ser tóxica e/ou patogênica b) apresentar viabilidade populacional elevada em torno de 10^6 – 10^8 UFC por grama de produto c) ser antagonista a patógenos d) possuir a capacidade de competir com a microbiota normal f) ser capaz de exercer efeitos benéficos à saúde estando esses documentados e validados clinicamente g) possuir capacidade de recuperação, concentração, congelamento, desidratação, estocagem e distribuição (FAO/WHO, 2002; SANDERS, 2008; VERNA; LUCK, 2010; CASAROTTI et al, 2014; SHARMA; DEVI, 2014).

Nem todas as espécies de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* apresentam as características essenciais requeridas para promover efeitos benéficos à saúde (VINDEROLA et al, 2000; SAAD, 2006; MARCO; TACHON, 2013; VANDENPLAS et al, 2015).

3.2.3 Mecanismos de ação dos probióticos

O pré-requisito para a ação probiótica é a adesão das estirpes probióticas na superfície intestinal e a subsequente colonização no sistema gastrointestinal humano. Estirpes de bactérias probióticas tendem a persistir mais tempo no trato intestinal e, assim, demonstram uma melhor possibilidade de efeitos metabólicos e imunomoduladores do que as cepas não aderentes ao trato intestinal (OELSCHLAEGGER, 2010).

Alguns autores sugerem que o modo de ação dos probióticos deve-se a vários processos que podem atuar independentes ou associados, como a exclusão competitiva com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes (OUWEHAND et al, 2000; CROSS, 2002; COPPOLA; TURNES, 2004; BENGMARK; GIL, 2006).

Segundo Macari; Furlan (2005), um exemplo de exclusão competitiva ocorre entre a bactéria probiótica do gênero *Bifidobacterium* com a bactéria patogênica *Escherichia coli* enteropatogênica. Estudos demonstraram efeito inibitório das bactérias probióticas em muitos organismos prejudiciais à saúde como: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Helicobacter* (SHERMAN et al, 2009; SALMINEN et al, 2010).

Outra ação sugerida por autores é de que os probióticos afetam os patógenos através da síntese de bacteriocinas (UTIYAMA, 2004; SAAD et al, 2013), de ácidos orgânicos voláteis (AUDISIO et al, 2000) e peróxido de hidrogênio (ATASSI; SERVIN, 2010).

3.2.4 Benefícios dos alimentos probióticos

Diversos benefícios à saúde são atribuídos aos probióticos, dentre eles: atividade antimicrobiana, modulação da constipação, atividade anticarcinogênica, redução do colesterol sanguíneo, melhora no quadro de pacientes com diabetes tipo 2 (resistentes a insulina), obesidade, melhoria na doença inflamatória do intestino entre outros (GAGGIA et al, 2010; GRANATO et al, 2010; SPYROPOULOS et al, 2011; BERTAZZONI et al, 2013; SAAD et al, 2013; FLOCH, 2014).

3.2.4.1 Ação dos probióticos na modulação da resposta imunológica

A primeira linha de defesa do organismo contra infecções e doenças causadas por microrganismos é a mucosa intestinal, em conjunto com a resposta imunológica específica do organismo. A imaturidade da microbiota intestinal é responsável pela vulnerabilidade do indivíduo a infecções, inflamações e hipersensibilidades. O uso de probióticos pode melhorar a composição da microbiota intestinal e desta forma aumentar e manter a barreira imunológica local, amenizando as respostas inflamatórias (OLIVEIRA et al, 2001).

O estímulo da resposta imune do hospedeiro, sugerido por alguns autores (PRESCOTT; BJÖRKSTÉN, 2007; SOUZA et al, 2010) ocorre devido aos probióticos serem responsáveis pelo aumento da atividade fagocitária, a síntese de IgA e a ativação de linfócitos T e B (FLESCH et al, 2014).

Os efeitos positivos causados pelos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial. A resposta imune pode ser aumentada, quando um ou mais probióticos são consumidos em conjunto e atuam sinergicamente, como parece ser o caso dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CAO; FERNÁNDEZ, 2005; SAAD, 2006).

3.2.4.2 Intolerância a lactose

A lactose é um bom substrato para as bactérias que o transformam em ácido láctico, a hidrólise enzimática da lactose é um processo de grande interesse tecnológico, já que os compostos resultantes (glicose, galactose) são facilmente fermentáveis e absorvidos pelo intestino humano. A β -galactosidase ou lactase é a principal enzima responsável por essa hidrólise (ORDÓÑEZ et al, 2005; LOWER et al, 2008).

Nos humanos a intolerância a lactose é provocada pela perda ou diminuição da atividade da lactase. A importância da ingestão de bactérias probióticas em indivíduos intolerantes a lactose deve-se ao fato de que tais bactérias auxiliam na quebra da lactose tornando-a digerível no intestino humano (ADAM et al, 2004).

3.2.4.3 Síndrome do intestino irritável

Estudo realizado durante 6 semanas, com 274 adultos portadores de síndrome do intestino irritável, demonstrou que após consumo de leite fermentado probiótico contendo a cultura *Bifidobacterium animalis* DN-173010, houve melhora nos sintomas de inchaço e desconforto abdominal e aumento na frequência das evacuações dos portadores da síndrome (GUYONNET et al, 2007).

3.2.4.4 Doenças alérgicas

Souza et al. (2010) realizaram levantamento bibliográfico sobre ensaios clínicos, em seres humanos, randômicos duplo-cegos, os quais avaliaram o efeito do consumo de alimentos probióticos em doenças alérgicas. Na Tabela 1, encontram-se os resumos dos trabalhos e as diferentes formulações de cepas probióticas utilizadas.

Tabela 1: Ensaios clínicos publicados (2004 a 2008), sobre a eficácia da suplementação de probióticos no tratamento e/ou prevenção das doenças alérgicas.

População	Tipo de probiótico e dose usada	Desfecho	Referência
Mulheres grávidas com risco de atopia N = 71	LGG, <i>B. lactis</i> (BB-12), 1 X 10 ¹⁰ UFC/dia do 1º trimestre até amamentação exclusiva	Filhos de mães com probióticos tiveram menor risco de sensibilização (OR=0,3; p=0,023). Leite materno com maior nível de TGF-β2. A suplementação probiótica não acelerou a tolerância em lactentes alérgicos ao leite de vaca.	HUURRE et al, 2008
Adultos saudáveis, com Dermatite atópica. 8 semanas de probióticos ou placebo,c/ duas semanas de intervalo.N=15	logurte com: <i>L.paracasei</i> 3,9x10 ⁸ ufc/g; <i>L.acidophilus</i> - 9x10 ⁴ ufc/g; <i>B.lactis</i> 5,9x10 ⁴ ufc/g	As culturas utilizadas induziram a colonização transitória da flora intestinal. Não houve mudança significativa nos sinais clínicos de Dermatite atópica.	ROESSLER et al, 2008
Adultos com rinite alérgica desencadeada por pólen. N=58	<i>B. longum</i> BB 2x10 ¹⁰ ufc/dia	A variação da microflora intestinal ocorreu nos dois grupos randômicos. Mas os suplementados com probióticos apresentaram maior estabilidade da microflora	ODOMAKI et al, 2007
Adultos receberam suplementação por 4 semanas ou placebo. N=24	<i>B.longum</i> BB 536 - 5x10 ¹⁰ ufc/dia	Em comparação com grupo placebo,os indivíduos que receberam o probiótico diminuíram os sintomas oculares causados pela polinose. Sugerindo que a BB 536 apresentou um efeito benéfico potencial nos sintomas de alergia a pólen	XIAO et al, 2006
Crianças com dermatite atópica associada a alergia ao leite de vaca. N=230	Grupo I: cápsulas com 5x10 ⁹ ufc de LGG;Grupo II:mix de probióticos (LGG- 5x10 ⁹ ufc, <i>B.breve</i> Bbi99- 2x10 ⁸ ufc, <i>P.freudenreichii</i> sp <i>shermanni</i> JS- 2x10 ⁹ ufc), Grupo III:placebo por 4 semanas	LGG melhora os sintomas da Dermatite atópica nos casos onde há hipersensibilidade via IgE	VILJANEN et al, 2005

*EDCRCP: estudo duplo-cego randômico controlado por placebo; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG (LGG ATCC 53103).

Adaptado de SOUZA et al, 2010.

3.2.4.5 Contribuição dos probióticos no desempenho de atletas

Além de estudos demonstrando auxílio no tratamento de doenças, os probióticos também podem contribuir para saúde e melhoria no desempenho dos praticantes de atividades físicas (GLEESON et al, 2004; CORTHESEY et al, 2007; LOLLO et al, 2013) , sendo descritos como úteis para atletas no combate ao estresse oxidativo (MARTARELLI et al, 2011) e melhoria na imunidade da mucosa intestinal (COX et al, 2010).

Probióticos podem ser utilizados indiretamente para maximizar o desempenho atlético, impedindo a imunossupressão causada por sessões prolongadas de exercícios físicos intensos, reduzindo assim a susceptibilidade do atleta à doença (NICHOLS, 2007) e a incidência de infecções agudas tais como: diarreias e seus sintomas associados (GUARINO et al, 2009).

3.3 *Bifidobacterium*

As bifidobactérias foram descobertas por Henry Tissier (do Instituto Pasteur) em 1906, que as isolou pela primeira vez em fezes de bebês amamentados por leite materno, denominando-as como *bacillus bifidus*. Tissier percebeu que as bifidobacterias eram capazes de expulsar bactérias causadoras de diarreia (GUARNER et al, 2008). Em 1917, Winslow propôs incluir a bactéria probiótica a família de *lacto-Bacillaceae* e três anos mais tarde Holland (1920) nomeou a estirpe descoberta por Tissier como *lactobifidus bacilo*. Em 1924 Orla-Jensen (microbiologista dinamarquês) reconheceu a existência do gênero *Bifidobacterium* mas devido a semelhança com o gênero *Lactobacillus* as incluiu neste gênero. O gênero compreendeu oito espécies e foi incluído na família das *Actinomycetaceae*.

Stackebrand e colaboradores (1997), por meio de análise de rRNA 16S, propôs uma nova estrutura hierárquica e incluiu o gênero *Bifidobacterium* com o gênero *Gardnerella* na família única de *Bifidobacteriaceae* na ordem das *Bifidobacteriales*.

O gênero *Bifidobacterium* inclui 30 espécies, 10 das quais são de origem humana (cáries dentárias, fezes e vagina), 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado. A maioria das espécies é isolada do trato gastrointestinal de mamíferos (KLIJN et al, 2005). As espécies descritas pelos autores encontram-se no Quadro 3 (WARD; ROY, 2005).

Quadro 3: Espécies de bifidobactérias isoladas de humanos e espécies utilizadas em produtos comerciais.

Espécies isoladas de humanos	Espécies usadas em produtos comerciais
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. longum</i>
<i>B. angulatum</i>	<i>B. animalis</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>
<i>B. catenulatum</i>	<i>B. lactis</i>
<i>B. dentium</i>	
<i>B. gallicum</i>	
<i>B. infantis</i>	

Fonte: (WARD; ROY, 2005)

Uma importante característica para auxiliar na identificação e seleção das espécies de bifidobactérias é o perfil de fermentação de carboidratos, todas as espécies fermentam glicose, galactose, frutose e lactose, com exceção de *Bifidobacterium gallicum* que não utiliza lactose para sua fermentação (TESHIMA, 2001).

São heterofermentativos, produzem os ácidos acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO₂ (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

As bifidobactérias caracterizam-se como microrganismos Gram-positivos, anaeróbios, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, podendo apresentar formas variadas como bacilos curtos e curvados a bacilos bifurcados, podem apresentar-se em formato de Y (BIAVATI et al, 2000; MIRANDA et al, 2011).

A temperatura ótima de crescimento das bifidobactérias está na faixa de 37 a 41°C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 25 a 28°C e acima de 43 a 45°C. O pH ótimo de crescimento está na faixa de 6,0 a 7,0 não ocorrendo crescimento abaixo de 4,5 a 5,0 ou acima de 8,0 a 8,5 (SHAH, 2007).

O aumento do valor nutritivo e terapêutico fornecido pelas bifidobactérias gerou interesse na incorporação desses em determinados alimentos, sendo os leites fermentados e outros produtos lácteos os veículos mais utilizados (PRASANNA et al, 2014).

3.3.1 *Bifidobacterium* em produtos lácteos

A maioria das cepas de *Bifidobacterium* crescem lentamente no leite, devido a sua baixa atividade proteolítica, o que dificulta sua aplicação em produtos lácteos fermentados. Embora o leite possua todos os nutrientes essenciais para o crescimento da bactéria probiótica, esses nem sempre encontram-se em formas aceitáveis ou em concentrações adequadas (OLIVEIRA et al, 2001; YONEZAWA et al, 2010).

Para contornar essa situação, ingredientes como: açúcares (glicose e galactose), fontes de proteína (extrato de levedura, extrato de fígado, peptonas) e diferentes vitaminas (SODINI et al, 2005; ZHAO; LI, 2008) podem ser adicionadas com objetivo de estimular o crescimento e atividade de bifidobactérias no leite. No entanto, a maioria destas fontes de proteínas não podem ser utilizadas em produtos lácteos devido a seus sabores indesejáveis característicos (MCCOMAS; GILLILAND, 2003).

Devido ao sabor indesejável tem sido utilizada a adição de compostos derivados do leite como aditivos, tais como soro de leite concentrado de proteína, a proteína de soro e hidrolisado de caseína (JANER et al, 2004; MARAFON et al, 2011; OLIVEIRA et al, 2011; MOHAMMADI et al, 2011). Segundo Kailasapathy; Chin (2000), o enriquecimento dos produtos lácteos fermentados com concentrado de proteína de soro de leite aumenta a capacidade de tamponamento do leite, retardando a diminuição do pH e impedindo a alteração do pH durante o armazenamento.

Além disso, substâncias podem ser adicionadas, para reduzir o potencial redox tais como ácido ascórbico e cisteína, criando um ambiente mais favorável para o crescimento das bifidobactérias (ROY, 2005).

Durante o seu crescimento, as bifidobactérias geralmente produzem ácido acético e ácido láctico a partir de lactose, no entanto essas não são capazes de gerar suficiente quantidades de ácido láctico para o fabrico de leites fermentados com aroma e sabor adequado. Por esse motivo, são muitas vezes incorporadas como co-culturas em produtos lácteos fermentados (ASHRAF; SHAH, 2011).

Bifidobactérias são consideradas como altamente susceptíveis ao oxigênio, embora essa tolerância dependa da espécie e o oxigênio pode afetar esses organismos pela sua toxicidade às células e pela produção de peróxido de hidrogênio (PRASANNA et al, 2014).

Dentre as diferentes espécies de *Bifidobacterium* a *B. animalis* subsp. *lactis* apresentou-se com maior potencial benéfico a saúde. A espécie é a mais utilizada industrialmente na elaboração de produtos probióticos pois tolera melhor a exposição ao oxigênio quando comparada as demais espécies do mesmo gênero. Essas são obtidas de fabricantes tradicionais de culturas lácticas como *Chistian Hansen*® (*Bifidobacterium lactis* BB-12) e *Sacco*® (*Bifidobacterium lactis*) (JANER et al, 2004; ELIZAQUÍVEL et al, 2011; AKALIN et al, 2012; YERLIKAYA, 2014).

Para o isolamento das bifidobacterias em produtos lácteos, é importante usar um meio de cultura que promova seletivamente o crescimento das mesmas, impedindo o crescimento de outras bactérias lácticas (BARRETO et al, 2003).

3.3.2 Meios de cultura utilizados para isolamento de *Bifidobacterium*

Vários meios seletivos têm sido desenvolvidos para enumeração de culturas puras de *Bifidobacterium* sp. (TERAGUCHI et al, 1978; BURFORD, 1989; LAROIA; MARTIN, 1991; ONGGO; FLEET, 1993; ARROYO et al, 1994).

Muitos desses meios não apresentam seletividade para bifidobacterias, permitindo o crescimento de outras espécies probióticas ou de bactérias lácticas, além disso, os meios contendo antibióticos podem reduzir o crescimento de bifidobacterias, tornando as contagens não representativas do número real de células viáveis presentes nos produtos probióticos (BOTELHO, 2005; ASHRAF; SHAH, 2011).

Os meios designados para a enumeração específica de bifidobactérias em geral são caracterizados pela presença de substâncias que reduzem o potencial de oxido-redução como o cloridrato de L-cisteína. Alguns apresentam antibióticos para inibir o crescimento de outras bactérias ácido lácticas (ROY, 2001).

Harmsen e colaboradores (1999), sugeriram a adição de antimicrobianos ao meio MRS (De Man; Rogosa; Sharpe, 1960) para realizar o isolamento da cultura probiótica *Bifidobacterium* sp., comprovando que a suplementação ao meio de cultura foi eficiente no crescimento da cultura probiótica inibindo o crescimento de outras bactérias lácticas.

Para a seletividade de *Bifidobacterium* sp. em alimentos fermentados que possuem outras bactérias lácticas os meios de cultura contendo NNLP (Ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio, sulfato de paromomicina) e dicloxacilina, vem sido adotados por alguns autores (LIMA et al, 2009).

3.4 Matriz Alimentar x Viabilidade de culturas probióticas

Os alimentos podem servir de veículo de microrganismos probióticos para o sistema gastrointestinal humano. As propriedades físico-químicas dos ingredientes presentes nos alimentos podem regular a colonização das bactérias probióticas, o crescimento e sobrevivência dessas culturas durante o trânsito gástrico pode ser afetado dependendo da matriz no qual se encontram (RANADHEERA et al, 2010). De acordo com Sanders; Marco (2010), poucos estudos em humanos e animais têm comparado a eficácia dos probióticos em diferentes matrizes alimentares e em formulações.

A formulação do produto pode conferir efeitos diretos sobre os microrganismos probióticos proporcionando uma barreira físico-química contra o ácido gástrico ou apresentando nutrientes específicos que podem ser seletivamente metabolizados pelas células probióticas (FLESCHE et al, 2014).

Alguns fatores como: teor de gordura, concentração de nutrientes, tipo de proteínas, açúcares e pH do produto podem afetar o crescimento de bactérias probióticas e sua sobrevivência nos alimentos. Portanto a formulação do produto pode ser manipulada para ajudar na sua eficácia (RANADHEERA et al, 2010).

Saxelin et al (2010), observaram a contagem de *B.animalis* subsp *lactis* Bb-12 após consumo em três diferentes produtos. Foi observada a contagem da cultura probiótica nos seguintes produtos: cápsula, iogurte reduzido de lactose e queijo com baixo teor de gordura, contendo inicialmente $1,8 \times 10^9$ ufc /100g em cápsula, 3×10^{10} no iogurte e $4,2 \times 10^7$ no queijo da cultura *B.animalis* subsp *lactis*. Os autores concluíram que na matriz alimentar iogurte as contagens de *B. animalis* subsp *lactis* mantiveram um maior número de células viáveis (7×10^9 UFC/g fezes) quando comparada aos demais produtos analisados. Porém, tanto a cápsula quanto o queijo mantiveram a contagem de células probióticas viáveis acima de 10^6 UFC/g de produto conforme exigido pela legislação, logo segundo os autores, essas matrizes também são um bom veículo para o transporte da cepa *B. animalis* subsp *lactis*.

Ingredientes prebióticos como frutoligossacarídeos (FOS) e galactoligossacarídeos (GOS) podem ser adicionados em produtos probióticos pois esses possuem efeito positivo na manutenção da viabilidade de culturas probióticas, principalmente das bifidobactérias durante o armazenamento (ROBERFROID, 2002; VAN LOO, 2004; MACEDO et al, 2008; NOBAKHTI et al, 2009; FLESCHE et al, 2014).

Burket e colaboradores (2012) observaram que, a adição de ingrediente prebiótico (FOS) estimulou o crescimento das culturas probióticas (*L. acidophilus* e *B. animalis lactis* BB-12) em leites fermentados, e somente com essa adição foi possível obter a contagem mínima das culturas conforme determinado pela legislação.

A Matriz alimentar mais utilizada para adição de culturas probióticas são alimentos com alta atividade de água como os produtos lácteos - queijos, iogurtes, sobremesas lácteas e leites fermentados - entretanto existem algumas limitações de consumo aos produtos lácteos, pois alguns consumidores são alérgicos a proteína do leite, além da exigência desses produtos serem armazenados a frio. Tais limitações iniciaram uma tendência no desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos (sucos de frutas, barras de cereais, produtos à base de soja, produtos à base de carne, salsichas fermentadas e produtos vegetais) (GRANATO et al, 2010; MOHAMMADI et al, 2011; MENEZES, 2011; CHEN ; MUSTAPHA, 2012; ANEKELLA ; ORSAT, 2013; ANNUNZIATA ; VECCHIO, 2013; VANDENPLAS et al, 2015; MRIDULA; SHARMA, 2015).

Os probióticos foram também formulados em matriz chocolate tendo sido demonstrada sobrevivência ideal das cepas probióticas (*L. helveticus* e *B. longum*) quando comparadas a métodos convencionais de formulação dos probióticos (POSSEMIERS et al, 2010).

Estudo realizado por Salomão e colaboradores (2013), demonstrou que um sorvete produzido com bactérias probióticas do gênero do *Lactobacillus* e *Bifidobacterium lactis* manteve-se com 10^7 UFC/g durante 90 dias armazenado a 15°C , conforme a legislação, exercendo sua atividade probiótica. Inicialmente foi elaborado um leite fermentado com culturas probióticas a 10^8 UFC/g, mas o batimento do leite fermentado, junção com demais ingredientes e durante seu congelamento para produção do sorvete contribuíram para redução das células viáveis das bactérias probióticas.

O emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados, principalmente em iogurtes, é bastante aceito pelos consumidores por estarem relacionados principalmente com a reputação prévia desses produtos como naturalmente saudáveis (SANDERS; MARCO, 2010). No entanto, há dificuldades de manutenção da viabilidade destes microrganismos ao longo da estocagem refrigerada. Esses pré-requisitos representam significantes desafios tecnológicos, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição ao oxigênio, calor e ácidos (GALLINA, 2011; MARCO; TACHON, 2013).

3.5 Rotulagem para Alimentos Probióticos

De acordo com a Lei 8078 do Código de Proteção e Defesa do Consumidor é por meio do rótulo dos alimentos que o consumidor tem acesso a informações como quantidade, características nutricionais, composição e qualidade, e sobre os riscos que os produtos podem apresentar (BRASIL, 1990).

Os rótulos dos alimentos probióticos devem seguir os Regulamentos Técnicos sobre Rotulagem de Alimentos Embalados: RDC n° 259 e RDC n° 360 (BRASIL, 2002a; BRASIL, 2003).

Segundo a Resolução RDC n°259/02, rotulagem é toda inscrição, legenda, imagem, matéria descritiva ou gráfica, escrita, impressa, estampada, gravada em relevo, litografada ou colada sobre a embalagem do alimento. Esta não deve utilizar vocábulos, sinais, denominações, símbolos ou outras representações gráficas que induzam o consumidor a equívocos ou erro em relação à verdadeira natureza do alimento.

A RDC nº360/03 define que a rotulagem nutricional é toda descrição destinada ao consumidor sobre as propriedades nutricionais de um alimento, compreendendo a declaração do valor energético e dos nutrientes, e também a declaração das propriedades nutricionais (Informação nutricional complementar).

A informação nutricional deve mencionar: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio, obedecendo à ordem aqui descrita. As unidades de medida que devem ser utilizadas são: quilocaloria (kcal) e quilojoules (kJ), para o valor energético; gramas (g), para proteínas, carboidratos, gorduras e fibra alimentar; e miligrama (mg), para sódio. Os demais componentes, de declaração voluntária, como vitaminas e minerais, podem ser expressos em miligramas (mg) ou microgramas (µg).

De acordo com a RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005 substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde possuem obrigatoriedade de registro (BRASIL, 2005).

Os alimentos probióticos devem indicar em seus rótulos qual microrganismo probiótico foi utilizado seguido da seguinte informação “ contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (BRASIL, 2008). Possuem uma legislação específica (BRASIL, 2002b) na qual no parágrafo 11 especifica os seguintes critérios para a rotulagem .

Devem conter as expressões em destaque e em negrito: "**Consumir somente a quantidade indicada na embalagem.**"; "**Gestantes, nutrizes e crianças somente devem consumir este produto sob orientação de nutricionista ou médico.**

As alegações devem estar associadas à quantidade de uso recomendada pelo fabricante. Além de indicarem os cuidados de conservação e armazenamento, antes e depois de abrir a embalagem.

No caso dos Probióticos, deve constar a quantidade dos microrganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto. Esta informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e ou de saúde do produto e fora da Tabela de Informação Nutricional (BRASIL, 2002b).

3.6 Leites Fermentados

“Produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007).

São considerados leites fermentados: Iogurte, Leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada (BRASIL, 2007). Os leites fermentados são diferenciados dependendo da cultura *starter* que será utilizada no processo de fermentação, estas podem ser observadas no Quadro 4.

Quadro 4: Definição dos leites fermentados de acordo com a cultura *starter* utilizada na fermentação.

Definição	Cultura <i>starter</i> utilizada
Iogurte	<i>S. thermophilus</i> e <i>L. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>
Leite Fermentado ou cultivado	Um ou vários dos seguintes cultivos: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>S.thermophilus</i> e/ou outras bactérias ácido-láticas
Leite Acidófilo	Exclusivamente com cultivos de <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Kefir	Elaborados com grãos de <i>Kefir</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , espécies dos gêneros <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> e <i>Acetobacter</i> com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de <i>Kefir</i> são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) e leveduras não fermentadoras de lactose (<i>Saccharomyces omnisporus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Saccharomyces exiguus</i>), <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp. e <i>S. thermophilus</i> .
Kumys	<i>L. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Coalhada	Cultivos individuais ou mistos de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico

Fonte: (BRASIL, 2007)

Os diversos tipos de leites fermentados produzidos são resultantes das diferentes microbiotas responsáveis pelo processo de fermentação do leite. Em termos gerais, a sua elaboração pode ser considerada bastante simples. O leite é pasteurizado (75°C/20s) (BRASIL, 2002c) e em seguida adiciona-se o cultivo iniciador selecionado (dependendo do produto em questão), este é incubado a 42°C. Os microrganismos provocam a acidificação e em muitos casos, a coagulação do produto e o desenvolvimento das características sensoriais típicas. Após a fermentação, o alimento é refrigerado para comercialização. Nos últimos anos a produção e o consumo de leites fermentados, em que se incluem microrganismos com propriedades probióticas, vêm adquirindo maior relevância (ORDONEZ et al, 2005).

3.6.1 Leite fermentado probiótico

Para elaboração de um leite fermentado probiótico, as espécies mais utilizadas são *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuterii*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* e *B.animalis* subsp. *lactis* (FERREIRA, 2003; GARCIA et al, 2012).

O uso de algumas culturas probióticas em leites fermentados é limitado, pois as culturas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem substâncias decorrentes da atividade fermentativa, com formação de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e ácido acético. Tais compostos podem ocasionar sabores estranhos (*off-flavors*) nos produtos finais, além da sensibilidade a uma série de fatores, como pH ácido e a presença de oxigênio (MORAIS; JACOB, 2006). Como alternativa vem sendo utilizadas culturas bioajustadores em conjunto com as culturas probióticas (ANTUNES, 2001).

3.6.2 Culturas bioajustadoras ou “*starter*”

Segundo Leroy; De Vuyst (2004), uma cultura *starter* pode ser definida como uma preparação microbiana, a ser adicionado à matéria-prima, contendo um grande número de células de pelo menos um microrganismo para produzir um produto alimentício fermentado.

O grupo das bactérias lácticas ocupa um papel central nessa técnica, acelerando e conduzindo o processo fermentativo. São utilizadas como culturas *starters* as bactérias convencionais do iogurte como *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (FERREIRA, 2003).

A adição direta de culturas selecionadas tem representado um avanço na elaboração de produtos fermentados, resultando em um alto grau de controle sobre o processo fermentativo e padronização do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004).

Segundo Lago (2009), as culturas bioajustadoras têm a finalidade de melhorar o sabor, aroma e textura, aumentando a taxa de crescimento, diminuindo o tempo de fermentação e evitando problemas de contaminação.

De acordo com Saarela e colaboradores (2000), a combinação mais apropriada de uma cultura *starter* a uma bactéria probiótica específica deve ser determinada por processo de seleção o qual irá avaliar o impacto das diferentes culturas *starters* sobre as propriedades sensoriais e a sobrevivência das bactérias probióticas. Deve ser utilizada preferencialmente uma cultura *starter* termofílica (45°C-70°C), pois as bactérias probióticas multiplicam-se bem a 37°C.

As culturas bioajustadoras devem tolerar o processo de fabricação ao qual serão submetidas e manter a viabilidade durante a estocagem, o que dependerá de fatores como pH, presença de aditivos e ocorrência de inibidores microbianos (CRUZ et al, 2011).

Estudo realizado por Saxelin e colaboradores (1999), observou que as contagens de células das estirpes probióticas (*L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* F19, e *B. lactis* BB-12) foram significativamente constantes em todas as combinações com as culturas *starters* (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) do leite fermentado, concluindo que algumas combinações de estirpes probióticas e culturas do iogurte, não promovem redução no número de bactérias probióticas. Porém, para cada cultura probiótica é importante selecionar um cultura suporte ideal para obter uma boa sobrevivência de todas as culturas em produtos fermentados na totalidade da sua vida de prateleira.

3.6.2.1 *Streptococcus thermophilus*

Pertencem ao gênero *Streptococcus*, família *Lactobacillaceae*, são cocos que formam cadeias curtas ou longas, e são homofermentativos (produção apenas de ácido lático) a partir da lactose do leite. Necessitam de vitaminas do grupo B e alguns aminoácidos como estimulantes de multiplicação, além de uma temperatura ótima de 37°C, mas a maior parte das cepas se multiplica a 50°C e são termodúricos, que sobrevivem à pasteurização (FORSYTHE, 2002; BISCAIA et al, 2004; ORDÓÑEZ-PEREIRA et al, 2005).

Para o cultivo e contagem seletiva de *Streptococcus láctico*, o meio M17 baseado na formulação descrita por Terzaghi; Sandine (1975), tem sido recomendado pela Federação Internacional de Laticínios (IDF, 1981) e Comitê da ISO (1985) para enumeração seletiva de *Streptococcus thermophilus* de iogurte.

3.6.2.2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo de bactérias ácido lácticos (BAL), são gram-positivos, catalase -negativas, capazes de produzir ácido lático como principal produto final da fermentação. Multiplicam-se muito devagar abaixo de 10°C, sendo que a maioria das cepas podem multiplicar entre 50 e 55°C (ORDÓÑEZ-PEREIRA et al, 2005).

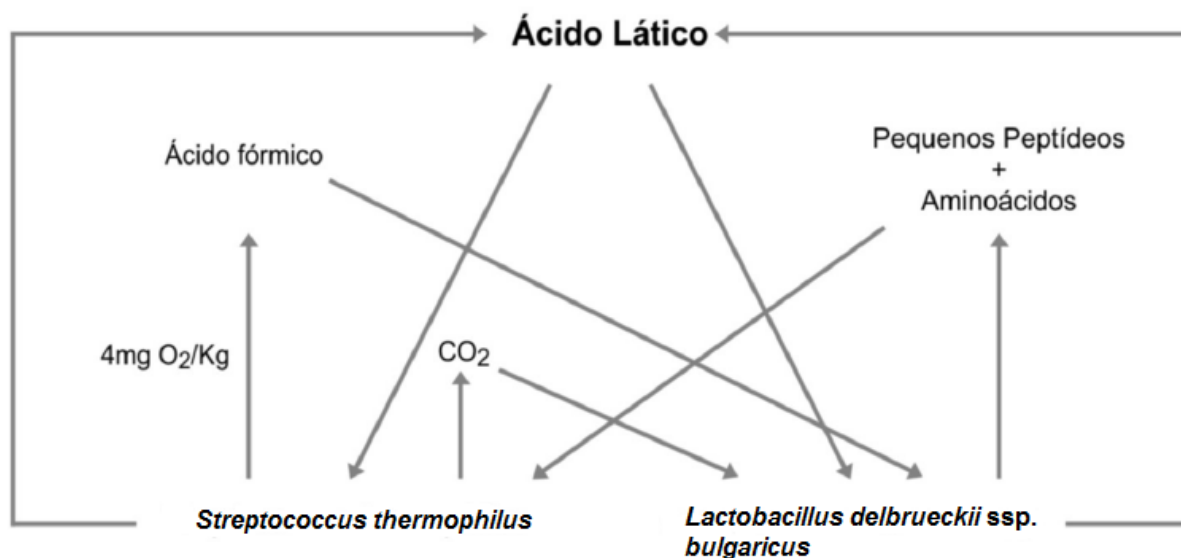
Esta bactéria possui propriedades como: atuar na produção de lactase (a enzima responsável pela quebra da molécula da lactose no trato digestivo) e apresentar natureza proteolítica, podendo facilmente quebrar proteínas e ampliar a biodisponibilidade de minerais, especialmente o cálcio (SAAD, 2006).

Hatermink e colaboradores (1997) desenvolveram o meio LAMVAB para o isolamento de espécies de *Lactobacillus*, esse é altamente seletivo devido ao pH baixo e presença de vancomicina (antimicrobiano), importante para inibir *Bifidobacterium* sp. no isolamento de *lactobacillus* em produtos lácteos probióticos.

3.6.2.3 Relação simbiótica entre *S.thermophilus* e *L.delbrueckii* ssp *bulgaricus*

Na elaboração de leite fermentado, quando adicionadas as culturas *starters*, durante a fermentação ocorre o consumo da lactose e a hidrólise das proteínas do leite, pelas culturas lácticas do iogurte, tais culturas desenvolvem um processo simbiótico, que resulta na produção de peptídeos, compostos ácidos e de aroma característicos, como ácido láctico e acetaldeído (CRUZ et al, 2011).

S. thermophilus e *L.delbrueckii* ssp *bulgaricus* exibem um comportamento altamente dependente durante essa etapa, o que é denominado relação simbiótica. *S. thermophilus* se multiplica de forma rápida, produzindo dióxido de carbono e ácido fórmico, os quais, por sua vez, estimulam a multiplicação de *L. bulgaricus*, através da redução do pH para seu valor ótimo de crescimento, que por sua vez, produz peptídeos e aminoácidos necessários para a multiplicação de *S. thermophilus*, conforme observado na (Figura 1). O primeiro, é então inibido em baixos valores de pH (4,2-4,4), enquanto que, para o segundo, isto não se apresenta como um obstáculo para a sua multiplicação; após determinado tempo de fermentação - 3horas, aproximadamente - a proporção de ambos deve ser igual (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).



Fonte: adaptado de WALSTRA et al, 2006

Figura 1: Relação simbiótica entre as culturas lácticas (*S.thermophilus* e *L.delbrueckii* ssp *bulgaricus*) durante a fermentação em leites fermentados e iogurtes.

3.6.3 Elaboração de leite fermentado probiótico

Na elaboração de leite fermentado probiótico as cepas probióticas podem ser adicionadas em três diferentes etapas da produção conforme observado na Figura 2. A cultura probiótica pode ou não participar como componente da cultura *starter*. No primeiro caso a cultura probiótica participa da fermentação e deve crescer atingindo populações acima de 10^6 UFC/g, podendo conter exclusivamente a cultura probiótica. Por outro lado, quando a cultura probiótica for adicionada concentrada, não se espera crescimento e o produto é apenas veículo. Nestes casos a adição da cultura probiótica concentrada pode ser feita junto com a cultura *starter* no início do processamento ou após a fermentação. De qualquer forma a viabilidade não pode ser comprometida durante vida útil do produto (FERREIRA, 2003).

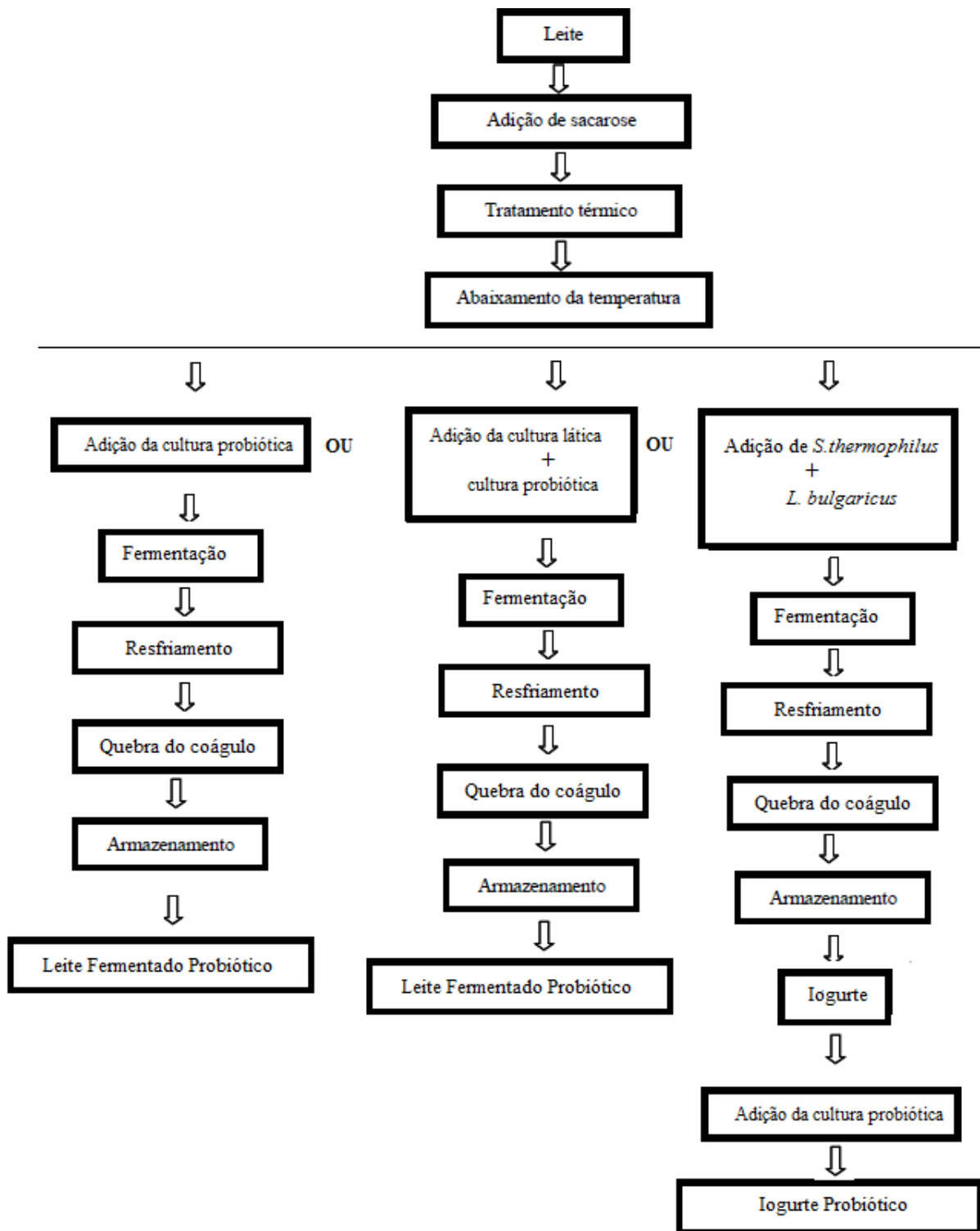


Figura 2: Fluxograma do Processo de produção do leite fermentado probiótico.
Adaptado de: CRUZ, 2011

Caso a produção do leite fermentado seja realizada exclusivamente com culturas probióticas, a fermentação pode não ocorrer de maneira adequada, pois as bactérias probióticas não crescem bem no leite. A adição da bactéria probiótica em conjunto com outras culturas lácticas permite que a fermentação aconteça de maneira eficiente, mas haverá dúvidas se o crescimento da cultura probiótica irá acontecer e se esse vai atingir a quantidade viável adequada. E o repentino contato da cultura probiótica com o produto pronto (iogurte), pode causar estresse para as culturas probióticas e ocasionar perda da viabilidade dessas culturas, pois a acidez do produto estará elevada (MAIOCCHI; YOMO, 2001; CHAMPAGNE; GARDNER, 2005).

Cunha et al. (2008), observaram que a adição da cultura probiótica *Bifidobacterium* spp. antes da fermentação em conjunto com as culturas lácticas apresentou um leite fermentado probiótico com culturas viáveis (10^6 UFC/g).

3.7 Desafios Tecnológicos na Produção de Alimentos Lácteos Probióticos

Para a indústria de alimentos com produção de produtos probióticos, torna-se um desafio na obtenção de tais produtos, pois deve haver a manutenção da funcionalidade, sem modificar as suas propriedades sensoriais (ONG et al, 2006).

Na produção de leites fermentados e iogurtes probióticos, são mencionadas três grandes adversidades (estresses) enfrentadas pelas bactérias probióticas, podendo levá-las a sua redução. Para que essas culturas mantenham-se viáveis durante a vida de prateleira, devem sobreviver a queda contínua do pH do produto ao longo do tempo de estocagem (pós-acidificação), ao estresse causado pela exposição com o oxigênio - que permeia através das embalagens plásticas - e ao estresse pelo frio, causado pela exposição às baixas temperaturas advindas da estocagem refrigerada. Em leites fermentados e iogurtes probióticos o produto é submetido aos três tipos de estresses, enquanto que apenas as baixas temperaturas podem afetar os demais produtos lácteos probióticos, queijos, sorvetes e sobremesas refrigeradas (CRUZ et al, 2011).

A relação simbiótica que ocorre entre as duas culturas - *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* - presentes nos iogurtes e adicionadas como culturas bioajustadoras na produção de leites fermentados tem como principal produto o ácido láctico, sendo responsável pela redução do pH desses produtos. O decréscimo desse parâmetro ao longo da estocagem de iogurtes e leites fermentados é denominado pós-acidificação. Culturas probióticas, especialmente *Bifidobacterium* spp. apresentam pouca ou nenhuma multiplicação em baixos valores de pH tornando-se um desafio para indústria a produção de iogurtes e leites fermentados com culturas probióticas. A solução tecnológica encontrada, consiste em promover uma exposição prévia da linhagem a baixos valores de pH, induzindo uma prévia tolerância do microrganismo (SANZ, 2007).

Outro fator que interfere na manutenção e multiplicação das bactérias probióticas em leites fermentados e iogurtes é o estresse oxidativo, pois essas bactérias são anaeróbicas. Durante o processo de produção desses produtos o *S. thermophilus* para exercer sua função no processo fermentativo, consome todo o oxigênio presente no meio incorporado, nas etapas de homogeneização e inoculação das culturas lácticas. Porém, ao longo da estocagem do produto em embalagens plásticas ocorre a entrada de oxigênio. Do ponto de vista industrial, a solução para essa exposição consiste expor essas culturas probióticas a elevadas concentrações de oxigênio assim como citado com o estresse ao ácido (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004).

As baixas temperaturas da estocagem refrigerada, também contribuem para que a viabilidade de culturas probióticas adicionadas a produtos lácteos seja prejudicada. Segundo estudo realizado por Damin et al. (2008), ocorreram variação na viabilidade de *L. acidophilus* e *B. animalis* presentes em formulações de leites fermentados ao longo de 28 dias de estocagem refrigerada. Assim como, as altas temperaturas no qual alguns leites fermentados e iogurtes são armazenados em alguns comércios, também podem prejudicar as culturas probióticas, promovendo sua redução (CRUZ et al, 2011).

Técnicas de microencapsulação de culturas probióticas têm sido utilizadas visando a proteção das células contra os principais estresses enfrentados por essas culturas (FAVARO-TRINDADE et al, 2011).

3.8 Legislação para Leites Fermentados

Os leites fermentados devem seguir as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 46, de 23 de Outubro de 2007. Devido à presença de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e de certas espécies de *Lactobacillus* com atividade probiótica, em alguns leites fermentados, estes podem ser classificados como alimento funcional.

A legislação brasileira vigente não exige contagens mínimas de bactérias lácticas viáveis totais para os leites fermentados ou cultivados. No caso de leites fermentados em que é mencionado o uso de bifidobactérias, a contagem específica de bifidobacterias deverá ser de no mínimo 10^6 UFC/g. Por outro lado, iogurtes e leite acidófilo devem apresentar contagens de 10^7 UFC/g de culturas lácticas durante toda a sua vida comercial e a temperatura de conservação e comercialização dos leites fermentados e iogurtes não devem ultrapassar a 10°C , para garantir essa viabilidade celular (BRASIL, 2007; CODEX, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de Leites Fermentados

Foram coletadas amostras de leites fermentados contendo *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. O critério utilizado para a coleta das amostras foi o tempo de fabricação com a categorização por faixa de período de tempo e diferentes marcas, sendo:

- Amostras de leite fermentado integral e desnatado (sabor morango)
- Três diferentes marcas denominadas A, B e C
- Faixa I: até 20 dias de fabricação
- Faixa II: 21 a 45 dias de fabricação

Cada uma das marcas de leite fermentado foi analisada dentro das faixas e marcas especificadas, sendo o experimento integralmente repetido três vezes. Os leites fermentados foram transportados até o laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

4.2 Microrganismos

Foram utilizadas nos testes de avaliação de produtividade dos meios de cultura para bifidobacterias, cepas comerciais de *B.animalis* ssp. *lactis* Bb-12 (Cristian Hansen®) e *B. animalis* ssp. *lactis* (SACCO®), além de uma cepa de origem humana denominada J7 isolada do intestino de lactentes de até duas semanas de idade, e identificados à nível de gênero durante o trabalho de doutorado de Oliveira (2011).

Para os testes de seletividade foram empregadas cepas de *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *S.thermophilus* isoladas de iogurtes comerciais.

As culturas estoque foram mantidas congeladas a -20°C em caldo MRS adicionado de 15% (vol/vol) de glicerol estéril. No momento da sua utilização, as culturas foram descongeladas e centrifugadas a 10.000g por 6 minutos, desprezado o sobrenadante e o pellet reconstituído com caldo MRS (HiMedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) e incubadas a 36°C/24 horas em jarra de anaerobiose. Este procedimento era repetido consecutivamente por três vezes.

4.2.1 Composição dos Meios de Cultura Seletivos para *Bifidobacterium*

4.2.1.1 Ágar MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos seletivo para *Bifidobacterium*:

Foi preparado o Ágar MRS (HiMedia, Mumbai, India) conforme indicado pelo fabricante e adicionado 0,05% de cisteína-HCL (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Foi preparada uma solução antimicrobiana - esterilizada por filtração em membrana 0,2µm - com as quantidades descritas no Quadro 5, que foi mantida sob refrigeração em frasco escuro por até 30 dias. O meio de cultura preparado foi resfriado em a temperatura de 50°C para cada 100 mL do meio de cultura foi adicionado asepticamente 1mL de solução antimicrobiana preparada.

Quadro 5: Descreve os reagentes e suas quantidades (mg) para o preparo de 100 mL da solução antimicrobiana.

Reagente	Quantidade (mg) por 100 mL água destilada
Ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)	200
Polimixina B (Inlab,São Paulo,SP,Brasil)	85
Kanamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)	500
Ácido iodoacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)	350
Cloreto de 2, 3,5 trifeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)	250

4.2.1.2. Meio reforçado diferencial para Clostrídios (RDCM) adicionado de azul da Prússia:

O meio *Reinforced Differential Clostridial Medium* (HiMedia, Mumbai, India) foi elaborado de acordo com fabricante e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento do meio foi adicionado 0,03% de azul da Prússia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em seguida a mistura foi homogeneizada e assepticamente distribuída nas placas de Petri.

4.2.1.3. Meio BIM-25:

A base deste meio é o *Ágar Reinforced Differential Clostridial Medium* (HiMedia, Mumbai, India) elaborado de acordo com fabricante e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em seguida foi utilizada a solução antimicrobiana contendo os reagentes descritos na tabela Tabela 4. Para cada 100mL do meio de cultura, foi adicionado 1mL da solução antimicrobiana. Em seguida o meio de cultura foi distribuído nas placas de Petri.

4.3 Seleção de Meio de Cultura para Enumeração de *Bifidobacterium*

Foram avaliados três meios de culturas quanto à produtividade para *Bifidobacterium* spp. e seletividade para as culturas bioajustadoras de pH mais comumente empregadas nos leites fermentados, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Foram testados os seguintes meios de cultura seletivos para *Bifidobacterium*: *Ágar MRS* adicionado 0,05% de cisteína e suplementado com antimicrobianos conforme descrito por Harmsen et al. (1999), *Reinforced Differential Clostridial Medium- RDCM* contendo azul da prússia (GHODDUSSI; ROBINSON, 1996) e BIM-25 (MUÑOZA; PARES, 1988).

4.3.1 Avaliação dos meios de cultura pelo método ecométrico

Utilizou-se o método ecométrico desenvolvido por Mosselt (1983), que determina a produtividade (para as culturas desejadas), e a seletividade (para as culturas que o meio deve apresentar impediência) dos meios de cultura seletivos.

Os microrganismos avaliados foram: *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* (L.B) e *S. thermophilus* (*S.T*) (isolados de iogurte natural comercial), *Bifidobacterium lactis* (SACCO Com. Imp. Exp. de Alim. Ltda), *Bifidobacterium lactis* BB12 (Christian Hansen, Valinhos, SP, Brasil) e cultura de *Bifidobacterium* de origem humana do laboratório de Microbiologia da UFRRJ, isoladas intestino de lactentes.

Para confirmação das culturas, foi realizada coloração pelo método de Gram e observadas no microscópio óptico, estas foram comparadas com padrões de imagens de microrganismos existentes.

As placas foram divididas em quatro quadrantes, nos quais foram estriados alíquotas de 1 μ L da cultura ativada (três transferências sucessivas em caldo MRS, sem flambar, seguindo a ordem de numeração crescente conforme observado na Figura 3.

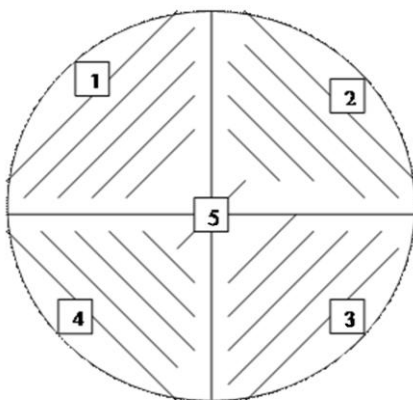


Figura 3: Esquema de inoculação pelo método ecométrico

As placas contendo os microrganismos *L.delbrueckii ssp bulgaricus* e *S.thermophilus* foram armazenadas em sacos de polietileno onde foi realizado vácuo com bomba manual para redução do oxigênio e incubadas a 36°C por 48 a 72 horas.

As placas contendo o microrganismo *Bifidobacterium* de origem humana e de origem animal foram incubadas a 36°C/72hs em câmara de anaerobiose conforme demonstrado na Figura 4 (A e B).

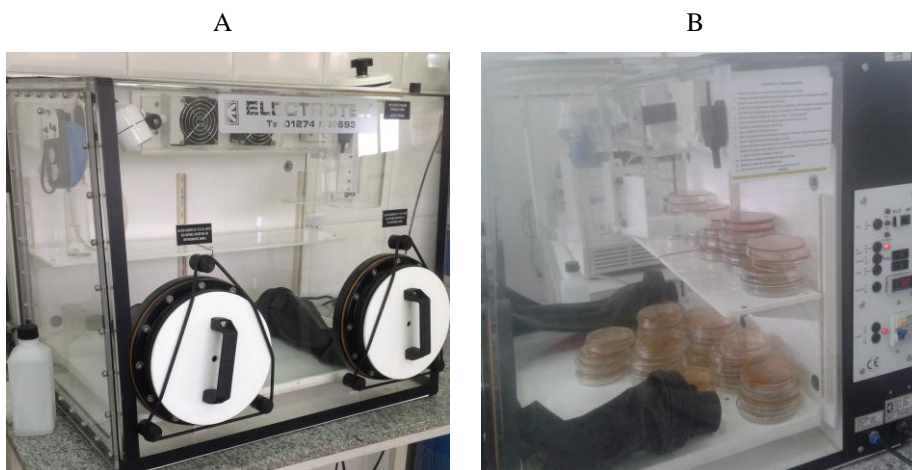


Figura 4 (A e B): Câmara de anaerobiose com temperatura a 36°C

Após incubação verificou-se crescimento, utilizando-se o critério: Foi atribuído valor 0,2 para cada linha completa de crescimento, nota máxima 1, para a última linha (5) atribuído valor 1,0.

Para os meios seletivos, as cepas não desejadas de culturas bioajustadoras, o Índice de Crescimento Absoluto (ICA) não deve ser maior que 2 e para as cepas desejadas de *Bifidobacterium* sp. não deve ser menor que 3.

4.4 Diluentes Utilizados para Validação da Metodologia para Quantificação do número de *Bifidobacterium* sob estresse em Leites Fermentados.

4.4.1 Água peptonada a 0,1%

Foi pesado 1g de peptona (Merck, Darmstadt, HN, Alemanha) para 1L de água destilada, foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e armazenado a 7°C até a utilização.

4.4.2 Água peptonada pré-reduzida

O diluente foi preparado a partir da mistura de três soluções denominadas de Base (B), (E) e (F), essas foram preparadas conforme descrito abaixo no Quadro 6.

Quadro 6: Descrição do preparo das soluções para elaboração da água peptonada pré-reduzida.

Solução	Preparo
Base B:	Foram pesados 1g de peptona e 0,5g de cisteína-HCL para 1L de água destilada, foi esterilizado a 121°C por 15 minutos
F - Solução indicadora de potencial redox:	Foi pesado 0,1g de resazurina (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) para 100 mL de água destilada. Foi esterilizado por filtração usando filtro 0,2µm. A solução foi armazenada em geladeira ao abrigo da luz. Foram utilizados 0,2mL da solução para 100 mL de diluente.
E -Extra de cisteína + piruvato:	Foram pesados 0,25g de cisteína-HCL e 1g de piruvato de sódio (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) para 100mL de água destilada. Esterilização foi feita por filtração usando filtro 0,2µm. A solução foi armazenada na geladeira em temperatura de refrigeração.

A solução base foi esterilizada a 121°C por 15 min, seguida foi resfriada e adicionada a solução de resazurina (0,2 para 100 mL ou 2 para 1 Litro). No momento do preparo final do diluente para análise, foram misturadas oito (8) partes de solução base (B) já contendo indicador de oxido-redução (F) a uma (1) parte da solução (E).

Imediatamente antes do uso, os tubos foram fervidos para expulsão do oxigênio e utilizados quando a coloração do meio passava de rosa escuro para rosa claro.

4.5 Contagem de Bifidobacterias e Culturas Bioajustadoras de pH em Leites Fermentados Comerciais

4.5.1 Enumeração de bifidobactérias nas amostras de leite fermentado

Concluída a etapa de seleção do meio de cultura onde foi constatado que, entre os meios testados, o que apresentou maior produtividade para *Bifidobacterium* sp e melhor seletividade para as culturas bioajustadoras de pH foi o meio MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos, procedeu-se a enumeração desta bactéria probiótica em leites fermentados comerciais.

Pesou-se 10 g de leite fermentado que foi homogeneizado com 90 mL do diluente (água peptonada 0,1% e pré-reduzida). Imediatamente antes do uso, o frasco e os tubos contendo a água peptonada pré-reduzida, foram fervidos para expulsão do oxigênio.

O indicador para que o diluente estivesse pronto para uso foi a coloração do diluente que passou de rosa escuro para rosa claro, conforme observado na Figura 5. A partir da diluição 10^{-1} foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-6} transferindo-se alíquotas de 1.0 mL para tubos com 9 ml de diluente.

Homogeneizou-se cada tubo de diluição em agitador de tubos vortex (Ika,Campinas,SP,Brasil). A seguir semeou-se em superfície do Ágar MRS contendo antimicrobianos, alíquotas de 0,1 mL das diluições com auxílio de uma alça de *Drigalsky* descartável estéril (Figura 6). As placas foram incubadas a 36°C por 72hs na câmara de anaerobiose.

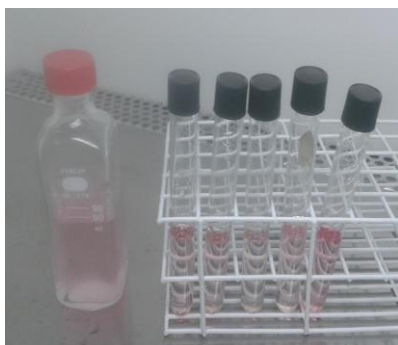


Figura 5: Água peptonada pré-reduzida pronta para ser utilizada

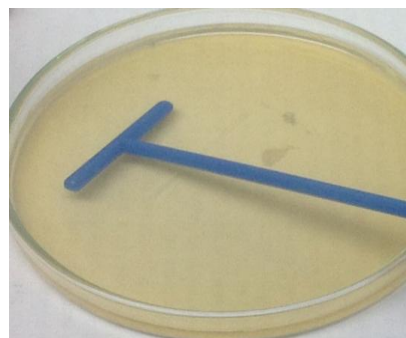


Figura 6: Espalhamento da alíquota no meio de cultura seletivo para *Bifidobacterium*

Após o período de 72hs de incubação das placas, colônias representativas foram avaliadas quanto a morfologia celular (coloração de Gram).

4.5.2 Enumeração de culturas bioajustadoras de pH em leites fermentados

Na enumeração das culturas bioajustadoras de pH foram utilizados o Ágar M17 e Ágar LAMVAB (HARTEMINK, 1997) respectivamente para *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*.

4.5.2.1 Composição dos meios de cultura seletivos para *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*.

- Meio seletivo para *Streptococcus thermophilus*:

O meio Ágar M17 foi formulado de acordo com instruções do fabricante e esterilizado a 121°C por 15 minutos em seguida foi distribuído nas placas de Petri.

- Meio de cultura seletivo para *Lactobacillus*:

Ágar LAMVAB (HARTEMINK, 1997) foi elaborado com a mistura de três soluções previamente preparadas - denominadas de A, B e C. A descrição e o detalhamento do preparo das três soluções estão descrito no Quadro 7.

Quadro 7: Descrição dos reagentes, as quantidades e os procedimentos usados para o preparo das soluções: A, B e C.

Solução A		Solução B		Solução C	
Caldo MRS (HiMedia, Mumbai, Índia)	Conc. dupla	Ágar-agar (HiMedia, Mumbai, Índia)	40 g/L	Vancomicina hidroclorato (95 % pureza) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil)	2 mg/mL
Cisteína-HCL	0,5 g/L	Esterilizar 121 ° C. Tempo 15 min.		Esterilizar utilizando filtro 0,2µm	
Verde de bromocresol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil)	0,05 g/L			Armazenar a temperatura 0- 4°C	
pH 5,0±0,1,0	Ajustar com HCl 4 M				
Esterilizar a 121°C. Tempo 15 min					

Após o preparo das três soluções, o meio de cultura foi elaborado assepticamente adicionando-se 10 mL da solução C a 500 mL da solução A e 500 mL da solução B. A mistura foi agitada para homogeneização e distribuição nas placas.

O procedimento de enumeração das culturas bioajustadoras de pH consistiu da semeadura em superfície de alíquotas de 0,1mL de diluições decimais seriadas nas placas contendo Ágar M17 e LAMVAB, seguindo o procedimento descrito no subtítulo 4.3.2. As placas foram incubadas a 36°C por 72 horas em sacos de polietileno onde foi feito vácuo com bomba manual para redução do oxigênio.

4.6 Confirmação da Identidade das Culturas *Bifidobacterium* sp. e Bioajustadoras

Colônias representativas de cada meio seletivo foram confirmadas pela morfologia celular através de coloração pelo método de Gram.

4.7 Conformidade dos Rótulos das Amostras de Leites Fermentados Comerciais Analisadas de Acordo com as Legislações de Rotulagem

Foram comparados os rótulos das três marcas de leites fermentados comerciais contendo a cultura probiótica *Bifidobacterium* sp com as legislações nacionais vigentes (BRASIL, 2002a; BRASIL, 2002b; BRASIL, 2003; BRASIL,2007; BRASIL, 2008).

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em valores de média \pm erro padrão. No presente estudo, para grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Para comparação entre dois grupos com um único fator de variação, foi utilizado o teste T *student*. Foram usados a estatística robusta e o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de Meio de Cultura para Enumeração de *Bifidobacterium* sp.

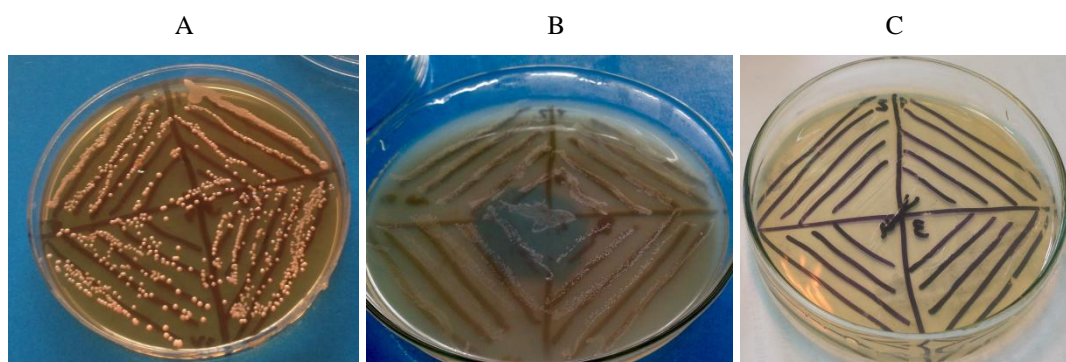
Nos testes ecométricos realizados com os três meios de culturas avaliados foram obtidos os seguintes resultados conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Índice de Crescimento Absoluto (ICA) em diferentes meios das culturas de *Bifidobacterium* spp., *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*.

Microorganismo	RDCM + Azul da prússia	BIM-25	MRS com cisteína + Antimicrobianos
<i>B.animalis</i> spp. <i>lactis</i> BB-12	5	5	5
<i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> SACCO	5	5	5
<i>Bifidobacterium</i> spp. de origem humana	5	5	5
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	0	5	0
<i>S. thermophilus</i>	5	0	0

O Índice de crescimento absoluto (ICA) observado para as culturas de *Bifidobacterium* de origem humana e animal foi máximo (5) nos três meios de cultura avaliados. Considerando a seletividade, apenas o meio MRS adicionado com cisteína e suplementado com antimicrobianos mostrou-se adequado, pois impediu totalmente o crescimento de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Os meios RDCM contendo azul da prússia e BIM-25 foram rejeitados por não apresentarem impedimento para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* respectivamente.

Na Figura 7 são demonstrados o crescimento de *Bifidobacterium lactis* (SACCO) realizado através do teste ecométrico com os meios de cultura Ágar MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos (A), Ágar Reinforced Differential Clostridial Medium (RDCM) contendo azul da Prússia (B) e BIM-25 (C).



Fonte: autora

Figura 7: Meio de cultura Ágar MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos (A), Ágar Reinforced Differential Clostridial Medium (RDCM) contendo azul da prússia (B) e BIM-25 (C) com crescimento da cultura *Bifidobacterium* spp. *lactis* (SACCO).

Foi possível concluir que o meio MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos potencializa a ação impediendo contra bactérias lácticas utilizadas como culturas bioajustadoras ou *starters* (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*), sendo seletivo a *Bifidobacterium* sp. na contagem em leites fermentados.

Tharmaraj; Shah (2003), avaliaram dezenove meios bacteriológicos para determinar a sua adequação na enumeração seletiva de *Bifidobacterium* sp. em conjunto com demais culturas (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium*, e *Propionibacterium*). Os autores sugeriram Ágar MRS suplementado com sulfato de neomicina, paromicina, ácido nalidíxico e cloreto de Lítio sob condições de incubação de anaerobiose a 37°C por 72 horas.

Ghodhosi; Robinson (1996), sugeriram o meio de cultura Àgar Reinforced Differential Clostridial Medium (RDCM) contendo azul da Prússia para a enumeração de *Bifidobacterium* sp. Alguns autores discordam da eficácia do meio de cultura sugerido, por acreditarem que esse não inibiu o crescimento de bactéria lácticas presentes nos produtos lácticos (RYBKA; KAILASAPATHY,1996; THARMARAJ ; SHAH, 2003; GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004).

Os mesmos autores observaram o crescimento de *Bifidobacterium* sp., *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* no meio de cultura RDCM contendo azul da prússia. Nesse trabalho, no mesmo meio de cultura e microrganismos testados pelos autores, somente foi observado o crescimento de *S.thermophilus*.

Trabalho realizado por Rybka; Kailasapathy (1996), relatou a importância de outra versão do meio de cultura RDCM contendo azul da prússia no isolamento de bifidobacterias, pois tal meio não apresentou seletividade para cultura de *Bifidobacterium* sp.

Munoa; Pares (1988), adicionaram agentes antimicrobianos (Polimixina B, Ácido nalidíxico, Ácido iodoacético e Cloreto de 2, 3,5 trifeniltetrazólio) a base RDCM formulando um novo meio de cultura, o BIM-25. Segundo os autores esse meio de cultura é considerado seletivo a enumeração de *Bifidobacterium* sp. em produtos lácteos. Porém, Rybka; Kailasapathy (1996) observaram que o meio de cultura BIM-25 inibiu o crescimento de seis espécies entre nove testadas de *Bifidobacterium*.

Man e colaboradores (1960) desenvolveram um meio de cultura denominado de MRS, para isolamento de bactérias lácticas e também utilizado para isolamento e enumeração de *Bifidobacterium* sp. (RYBKA; KAILASAPATHY,1996; DAVE; SHAH, 1996; MELI et al, 2013; MARTINEZ et al, 2015).

Sykes; Skinner (1973), observaram que a adição de cisteína ao meio de cultura MRS, favoreceu seu crescimento por reduzir o potencial redox e favoreceu as condições anaeróbicas. Porém a cisteína não possui efeito inibitório, sendo o meio MRS adicionado de cisteína-HCL não seletivo (PACHER; KNEIFEL, 1996; ROY, 2001; LEIVERS et al, 2011;WU et al, 2012).

Harmsen e colaboradores (1999), observaram que adicionando componentes antimicrobianos ao meio de cultura MRS, este tornou-se seletivo a *Bifidobacterium* sp. na enumeração de produtos lácticos, incluindo leite fermentados e iogurtes, pois os agentes antimicrobianos (Ácido nalidíxico, Polimixina B, Kanamicina, Ácido iodoacético e Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) inibiram as demais culturas lácticas.

Trabalho de Vinderola; Reinhermer (1999),verificou ser o meio de cultura MRS, sem adição de antimicrobianos, não seletivo para culturas probióticas em leites fermentados, pois houve crescimento das culturas *starters*. Os autores utilizaram Ágar MRS adicionado de antimicrobianos (Ácido nalidíxico, Polimixina B, Kanamicina) concluindo serem esses eficazes.

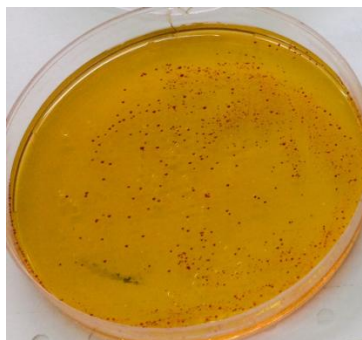
5.2. Contagem de Bifidobacterias e Culturas Bioajustadoras de pH em Leites Fermentados Comerciais

5.2.1. Influência do tempo de fabricação dos leites fermentados na viabilidade de *Bifidobacterium* sp.

Para realizar o isolamento da cultura probiótica *Bifidobacterium* sp. presente nas três marcas de leites fermentado comerciais foi utilizado diluente pré-reduzido elaborado com a adição dos seguintes ingredientes: cisteína-HCL, piruvato de sódio e resazurina.

Apesar das marcas avaliadas especificarem a espécie de *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* utilizada nos seus produtos, o presente estudo não teve como objetivo confirmar a espécie.

A contagem de *Bifidobacterium* sp. nas marcas de leite fermentado A, B e C em duas diferentes faixas (I e II) foi realizado utilizando meio de cultura MRS adicionado de cisteína-HCL e suplementado com antimicrobianos. O crescimento de *Bifidobacterium* sp. formando colônias isoladas da amostra de leite fermentado pertencente a faixa I da marca C, pode ser observado na Figura 8.



Fonte: autora

Figura 8: Colônias de *Bifidobacterium* sp. isoladas da amostra de leite fermentado da marca C pertencente a faixa I. Crescimento das colônias no meio de cultura MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos.

Os resultados das contagens de *Bifidobacterium* sp. nos leites fermentados das marcas A, B e C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II) são demonstrados na Figura 9. Não foram observadas diferenças significativas quanto as faixas na contagem de *Bifidobacterium* sp. nas amostras de leites fermentados avaliados.

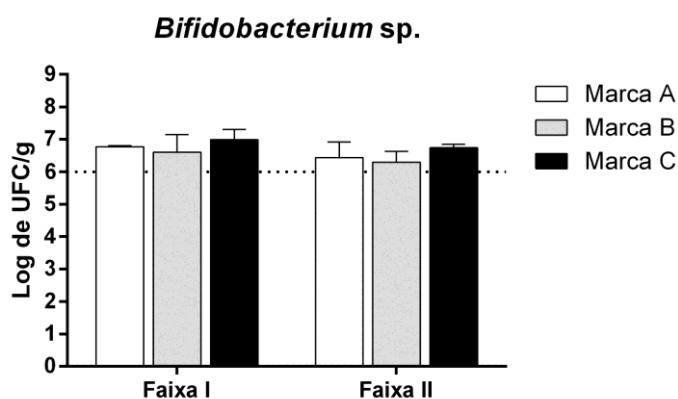


Figura 9: Médias e erro padrão das contagens de *Bifidobacterium* sp. em leites fermentados das marcas A, B e C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II). A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira (BRASIL, 2002).

Dentre as marcas de leites fermentados (A, B e C) analisadas, todas possuíam a quantidade mínima (10^6 UFC/g) de *Bifidobacterium* sp. exigida pela legislação (BRASIL, 2007).

O diluente água peptonada (0,1%) foi utilizado na enumeração de *Bifidobacterium* sp. em produtos lácteos por alguns autores (ARROYO et al, 1995; COLLINS; HALL, 1984; GHODDUSSI;ROBINSON, 1996; INGHAM, 1999; KNEIFEL et al, 1993; LAROA;MARTIN, 1991; PAYNE et al, 1999; SHAH et al,1995; SHIN et al, 2000). No caso dos leites fermentados as culturas de *Bifidobacterium* sp. encontram-se injuriadas devido as condições de processamento e armazenamento. Em razão ao fato, alguns autores recomendam a adição de agentes que favoreçam o crescimento da *Bifidobacterium* sp. em diluentes e meios de culturas para uma contagem adequada em produtos lácteos, especialmente leites fermentados (COLLINS; HALL 1984; HARTEMINK; ROMBOUTS, 1999; BLANCHETTE et al, 1996).

Ferreira (2003), ressalta que de um modo geral, as bifidobacterias não crescem muito bem no leite, produzem pouco ácido, prolongando o tempo de fermentação e para iniciar o crescimento, exigem um meio com baixo potencial de oxi-redução.

A adição de cisteína-HCL ao diluente favorece a recuperação de *Bifidobacterium* sp. na enumeração de leites fermentados probióticos, alguns autores também utilizaram um diluente adicionado de 0,05% de cisteína- HCL (HARTEMINK; ROMBOUTS, 1999; BLANCHETTE et al, 1996; ROY, 2001).

Alguns estudos relatam a utilização de caldo *Wilkins-Chalgren* para recuperar *Bifidobacterium* sp. em produtos lácteos, dentre os ingredientes presentes no caldo está o piruvato de sódio (RADA; PETR, 2000; TROJANOVA et al, 2004; COSTA, 2012). Neste trabalho adicionou-se o piruvato de sódio ao diluente elaborado com objetivo de recuperar a cultura probiótica e promover seu crescimento adequado. Ainda no mesmo diluente elaborado foi adicionado solução de resazurina com objetivo de verificar o estado de oxi-redução do diluente decorrente da expulsão do oxigênio presente, auxiliando na manutenção de um meio anaeróbico, já que *Bifidobacterium* sp. é um microrganismo anaeróbio aerotolerante.

Esse ingrediente também foi utilizado por alguns autores na recuperação e isolamento da *Bifidobacterium* sp. (TANAKA; MUTAI, 1980; MOURA et al, 2007; CHUNG et al, 2007).

Um número de diferentes marcas de iogurtes probióticos comerciais foram analisadas na Austrália (ANON, 1992; SHAH, 2000; SHAH et al, 1995) e na Europa (IWANA et al, 1993) para avaliar a contagem de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. Todos os estudos observaram um número reduzido destes microrganismos, principalmente de *Bifidobacterium* sp. (KAILASAPATHY, 2006).

Estudo realizado na Suíça, observou a contagem de *Bifidobacterium lactis* (Bb 12) e *Bifidobacterium animalis* DN 173010 em leites fermentados comerciais e todos apresentaram contagem de 10^6 UFC g⁻¹ de bifidobactérias. Apresentando-se viáveis conforme também observado no presente estudo (GRAND et al, 2003).

Vinderola e colaboradores, (2000) avaliaram a viabilidade de bactérias probióticas em iogurtes comerciais argentinos durante seu armazenamento refrigerado, o estudo observou a influência do ácido láctico, presente nesses produtos, sobre as culturas probióticas porém o estudo avaliou a cultura *Bifidobacterium* de origem humana, *B. bifidum*. Foi realizada a contagem das bactérias probióticas em diferentes faixas de pH (5,5; 4,5 e 3,5) e a contagem de células viáveis foram realizadas semanalmente durante 4 semanas. Foi observado em iogurte integral e desnatado, na data de expiração do produto (4 semanas), que o conteúdo *B. bifidum* foi menor do que o nível mínimo recomendado (10^6 UFC/g). Segundo os autores esses resultados indicam que o iogurte não representa um veículo adequado para bactérias probióticas testadas conforme relatado também por Modler; Villa-Garcia (1993), entretanto Kailasapathy; Rybka (1997), consideraram o iogurte como um veículo adequado para *B. bifidum*.

Urnau e colaboradores (2012) constataram que existem poucas marcas de leites fermentados probióticos no Brasil, os autores encontraram cinco diferentes marcas contendo as espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Dentre as marcas analisadas foi observado que as bifidobactérias apresentavam-se viáveis, contendo mais de 10^6 UFC/g nos leites fermentados.

A maioria dos trabalhos encontrados sobre a viabilidade de *Bifidobacterium* sp. em leites fermentados realizaram a contagem com a produção do próprio leite fermentado ou iogurte probiótico (KAILASAPATHY, 2006; CUNHA et al, 2008; GALLINA et al, 2011; CASAROTTI et al, 2014; BURKERT et al, 2012) ao contrário do presente estudo que coletou leites fermentados comerciais contendo *Bifidobacterium* sp.

Kailasapathy (2006), realizou a contagem de *Bifidobacterium lactis* em iogurte elaborado, concluindo que após 7 semanas de armazenamento, ocorreu um decréscimo de 3 log no número de células da espécie de *B. Lactis*. Como alternativa sugeriu o microencapsulamento da cultura probiótica observando que a redução foi menor quando utilizada essa técnica. Em contrapartida, Casarotti e colaboradores (2014), observaram que a cultura *B. animalis* pura ou em conjunto com culturas *starters*, apresentaram alta viabilidade (10^9 UFC/mL) ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado.

Cunha e colaboradores (2008), também observaram que a cultura de *Bifidobacterium lactis* manteve-se viável (10^6 UFC/mL) em leite fermentado produzido.

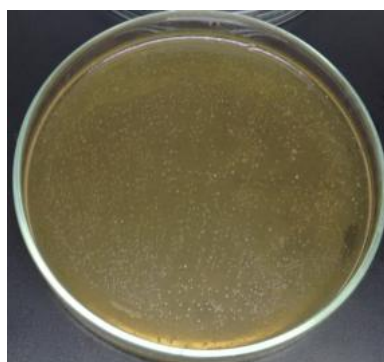
Gallina e colaboradores (2011), realizaram a contagem de *Bifidobacterium lactis* em leites fermentados com e sem adição de prebióticos, os autores observaram que o leite fermentado produzido apenas com a cultura probiótica *B. lactis* manteve a quantidade adequada 10^6 UFC/g até 15 dias de armazenamento refrigerado. Tal resultado foi confirmado por Burkert e colaboradores (2012), que realizaram a contagem de um leite fermentado sabor morango produzido com *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. (bb-12) e *S. thermophilus*. O estudo realizou a contagens das culturas probióticas após elaboração do leite fermentado com adição e sem adição de prebiótico.

A cultura probiótica *Bifidobacterium* sp. (Bb-12) manteve-se viável mesmo sem a adição de prebiótico, apresentando contagem mínima de $5,58 \times 10^6$ UFC/mL conforme exigido pela legislação (BRASIL, 2007) e observado nos resultados do presente estudo.

5.2.2. Influência do tempo de fabricação dos leites fermentados na viabilidade de *S.thermophilus*

Dentre as três marcas de leites fermentados analisadas (A, B e C), todas possuíam a cultura *S. thermophilus* em conjunto com a cultura probiótica *Bifidobacterium* sp.

O crescimento das colônias isoladas na marca B da amostra de leite fermentado pertencente a faixa II pode ser observado na figura 10. A diluição demonstrada na figura é a primeira (10^{-1}).



Fonte: autora

Figura 10: Colônias de *S. thermophilus* no meio de cultura M17, isolados da marca B da amostra de leite fermentado (Faixa II), primeira diluição (10^{-1}).

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças significativas quanto as faixas (I e II) na contagem de *S. thermophilus* nas amostras de leites fermentados dos fabricantes A, B e C conforme observado na figura 11.

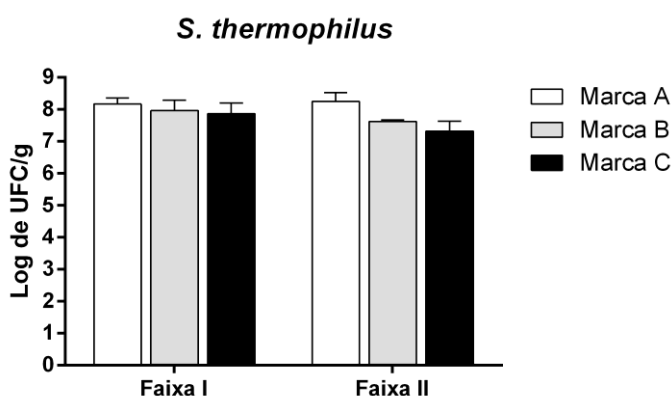


Figura 11: Média e erro padrão das contagens de *S. thermophilus* nos leites fermentados dos fabricantes A, B e C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II).

No presente estudo não foi observada diferença significativa na contagem de *S.thermophilus* presente em três marcas comerciais de leites fermentados sabor morango. Foram avaliadas duas faixas de pós fabricação, tanto no período de até 20 dias pós fabricação (FAIXA I) quanto no período de até 45 dias de pós fabricação (Faixa II) estatisticamente não houve decréscimo significativo, apresentando a contagem acima de 10^7 UFC/mL. O mesmo foi observado por alguns autores (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000; CASAROTTI et al, 2014).

A legislação Brasileira não exige contagem mínima de bactérias lácticas em leites fermentados, sendo esse utilizado conforme preferência do fabricante, porém, no caso dos iogurtes em que é obrigatoriedade o uso de *S.thermophilus* e *L.bulgaricus*, estes devem conter contagem mínima de 10^7 UFC/g (BRASIL, 2007).

Vinderola; Reinheimer (2000), observaram que não houve diferença significativa na contagem de *S.thermophilus* presente em leite fermentado probiótico elaborado inicialmente com 10^8 UFC/mL do produto. O mesmo foi observado por Casarotti e colaboradores (2014), segundo os autores a cultura *starter S.thermophilus* utilizada na elaboração de alguns leites fermentados probióticos não reduziu sua contagem durante 28 dias de armazenamento refrigerado em um leite elaborado com a cultura *starter* em conjunto com culturas probióticas, *S. thermophilus* manteve a contagem de 10^9 UFC/ml (inicialmente inoculado).

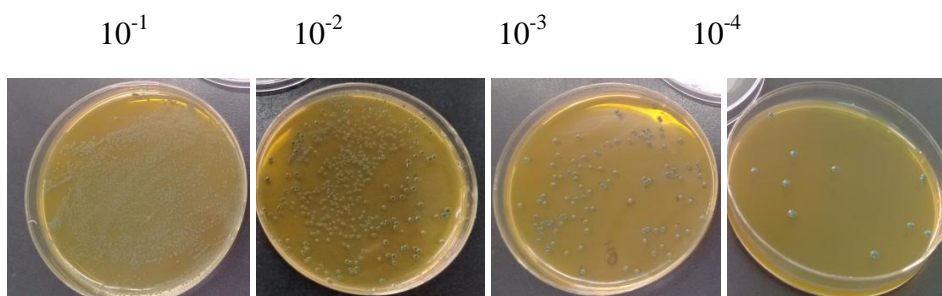
5.2.3. Influência do tempo de fabricação dos leites fermentados na viabilidade de *Lactobacillus* sp.

Dentre as três marcas de leites fermentados sabor morango (A, B e C) analisadas, apenas a marca C utiliza a cultura *Lactobacillus* sp. em conjunto com a cultura probiótica (*Bifidobacterium* sp.).

De acordo com a legislação brasileira, o leite fermentado pode conter um ou vários cultivos dos seguintes microrganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-lácticas (BRASIL, 2007).

Conforme observado na literatura as principais culturas *starters* utilizadas são *S.thermophilus* e *L.delbrueckii* spp *bulgaricus*, porém podem ser empregadas diferentes espécies de bactérias lácticas (BRASIL, 2007; VINDEROLA; REINHEIMER, (2000); FERREIRA, 2003; HERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ, 2012; YERLIKAYA, 2014).

No presente estudo não identificou-se a espécie de *Lactobacillus* encontrada. O isolamento de *Lactobacillus* sp. utilizando meio de cultura LAMVAB também foi relatado por outros autores (COEURET; GUEGUEN; VERNOUX, 2004; MOYANO et al, 2008). O crescimento das colônias isoladas na marca C (Faixa I) da amostra de leite fermentado nas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-4} podem ser observadas na Figura 12.



Fonte: autora

Figura 12: Colônias de *Lactobacillus* sp. no meio de cultura LAMVAB, nas diluições de 10^{-1} a 10^{-4}

De acordo com o método estatístico *T student*, não foi observada diferença significativa nas diferentes faixas (I e II) na contagem de *Lactobacillus* sp. na amostra de leite fermentado da marca C (Figura 13).

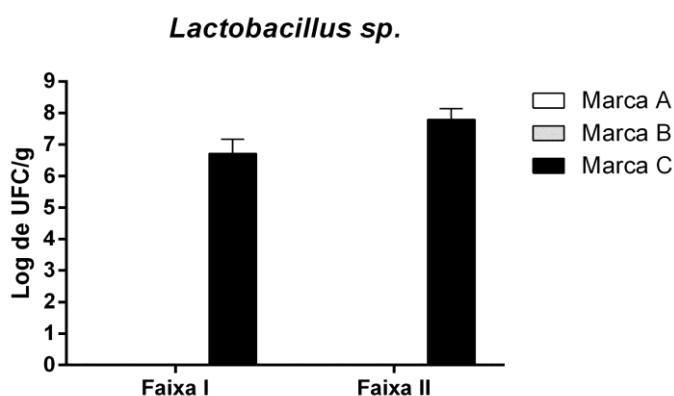


Figura 13: Média e erro padrão na contagem de *Lactobacillus* sp. na amostra de leite fermentado da marca C com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II).

No presente estudo não observou-se diferença significativa na contagem de *Lactobacillus* sp. presente em uma marca de leite fermentado sabor morango comercial. Foram avaliadas duas faixas de pós fabricação, tanto no período de até 20 dias pós fabricação (FAIXA I) quanto no período de até 45 dias de pós fabricação (Faixa II), estatisticamente não houve decréscimo significativo, apresentando a contagem acima de 10^6 UFC/mL. Assim como observado pelos autores (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000; HERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ, 2012).

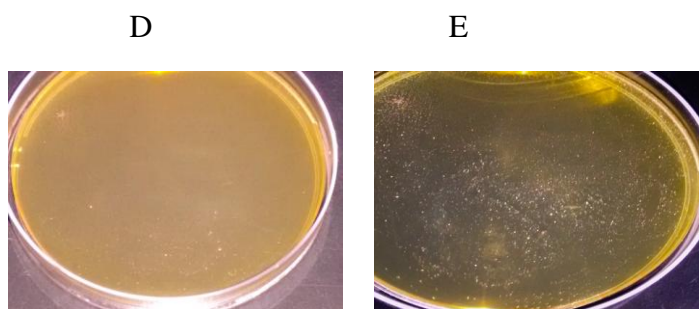
Diversos autores observaram a redução de *L.bulgaricus* em produtos lácteos em conjunto com *Bifidobacterium* sp. devido a competição por nutrientes com as bifidobactérias. Segundo os autores a morte de *L. bulgaricus* pode ser atribuída também à produção de ácido acético pelas bifidobactérias (SAMONA et al,1996; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000; HERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ, 2012).

A legislação Brasileira não exige contagem mínima do microrganismo em leites fermentados, sendo esse utilizado conforme preferência do fabricante, porém, no caso dos iogurtes este deve conter contagem mínima de 10^7 UFC/g (BRASIL, 2007).

5.3 Comparação dos Diluentes água peptonada 0,1% e água peptonada pré-reduzida na Recuperação de *Bifidobacterium* sp. presentes nos Leites Fermentados

Foi realizada uma comparação dos diluentes água peptonada 0,1% e água peptonada pré-reduzida (contendo cisteína-HCL, piruvato e solução de resazurina) na recuperação e crescimento de *Bifidobacterium* sp. presentes nas amostras de leites fermentados comerciais.

Na figura 14, podem ser observadas as placas da diluição 10^{-1} no meio de cultura MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos utilizando o diluente água peptonada 0,1% (D) e água peptonada pré-reduzida (E).



Fonte: autora

Figura 14: Colônias de *Bifidobacterium* sp. nas placas com meio de cultura MRS adicionado de cisteína e suplementado com antimicrobianos nas diluição decimal de 10^{-1} com diluente água peptonada (D) e água peptonada pré-reduzida(E).

A comparação dos diluentes foi testada, utilizando o teste ANOVA de duas vias, os resultados obtidos nas contagens realizadas utilizando os diluentes: água peptonada 0,1 % e água peptonada pré-reduzida, considerando as diferentes faixas de tempo de fabricação em três diferentes marcas de leites fermentados comerciais.

5.3.1 Comparação dos diluentes na contagem de *Bifidobacterium* sp. em três marcas de leite fermentado da FAIXA I

Os resultados obtidos pelo teste estatístico utilizado não verificaram diferenças significativas entre as marcas de leites fermentados testadas e a interação entre as variáveis experimentais. Entretanto foi observado um efeito significativo no tipo de diluente utilizado na contagem da *Bifidobacterium* sp $F(1,10)=5,33$; $p=0.04$ na faixa I, conforme observado na Tabela 3 e na Figura 15.

Tabela 3: Avaliação do uso de Água Peptonada Pré-Reduzida na contagem de *Bifidobacterium* sp. em três marcas de leite cultivado ou fermentado da FAIXA I.

ANOVA	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (2, 10) = 1.581	p = 0.2533
Diluente	F (1, 10) = 5.337	p = 0.0435
Marca	F (2, 10) = 0.4712	p = 0.6375

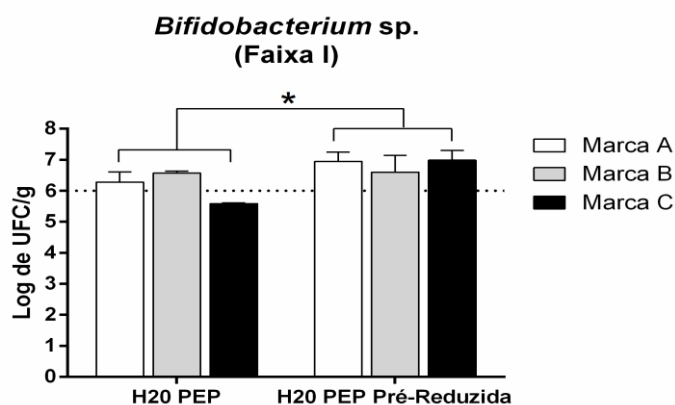


Figura 15: Influência da pré-redução do diluente na recuperação de bifidobacterias nos leites fermentados da faixa I. A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira. * representa $P < 0,05$ quando comparado à condição controle.

Conforme indicado na Figura 15, foi possível observar que a utilização do diluente água peptonada pré-reduzida (cisteína-HCL, piruvato e resazurina) resultou em melhor recuperação da cultura de *Bifidobacterium sp.* presentes na marca C. Essa maior recuperação não influenciou a contagem das marcas A e B quanto ao aspecto do cumprimento da legislação porém na marca C as contagens foram inferiores a 1×10^6 UFC/g, o que reprovaria o produto.

5.3.2 Comparação dos diluentes na contagem de *Bifidobacterium sp.* em três marcas de leite fermentado da FAIXA II

Na faixa II, foram observadas diferenças significativas do tipo de diluente [$F(1,11)=6,79$; $p=0,02$] e da interação entre as variáveis experimentais [$F(2,11)=10,18$; $p=0,003$]. Como o efeito da interação foi significativo, foi realizado o pós-teste de Bonferroni. Através desse teste foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) do tipo de diluente apenas na marca C (Tabela 4 e Figura 16).

Tabela 4: Avaliação do uso de Água Peptonada Pré-Reduzida na contagem de *Bifidobacterium sp.* em três marcas de leite cultivado ou fermentado da FAIXA II.

ANOVA	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (2, 11) = 10.18	p = 0.0031
Diluente	F (1, 11) = 6.794	p = 0.0244
Marca	F (2, 11) = 2.911	p = 0.0967

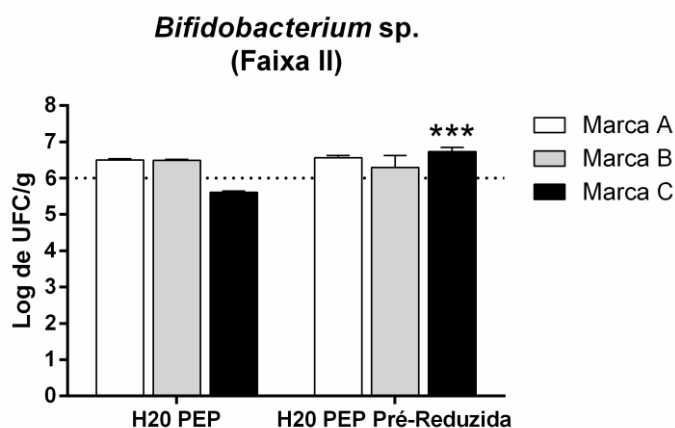


Figura 16: Gráfico da avaliação do diluente água peptonada pré-reduzida na contagem de *Bifidobacterium* sp. em amostras de leite fermentado da faixa II. A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira. *** representa $p < 0,001$ quando comparado à condição controle.

Conforme observado na Figura 16, o diluente água peptonada pré-reduzida recuperou melhor a cultura de *Bifidobacterium* sp. na amostra de leite fermentado da marca C, o valor mínimo exigido só foi observado com o diluente pré-reduzido, com a água peptonada a 0,1% esse valor ficou abaixo do exigido (10^6 UFC/g).

Na literatura pesquisada não foram encontrados estudos comparando o diluente água peptonada a 0,1% com diluente contendo os ingredientes utilizados no dileuente água peptonada pré-reduzida na recuperação de *Bifidobacterium* sp em produtos lácteos, especialmente em leites fermentados.

5.3.3 Influência do teor de gordura do leite fermentado na recuperação de *Bifidobacterium* sp. e cultura bioajustadora *S. thermophilus*.

5.3.3.1 Influência do Teor de Gordura do Leite Fermentado na Recuperação de *Bifidobacterium* sp.

Dentre as três marcas de leites fermentados sabor morango encontradas no comércio do Rio de Janeiro, apenas a marca A possuía as opções integral e desnatado. As marcas B e C apresentavam-se apenas como leite fermentado desnatado, não sendo possível realizar uma comparação da contagem de bactéria probiótica em relação ao teor de gordura.

Conforme observado na figura 17, o teor de gordura na amostra de leite fermentado de marca A, não influenciou significativamente a manutenção da viabilidade de *Bifidobacterium* sp. em nenhuma das duas faixas (I e II).

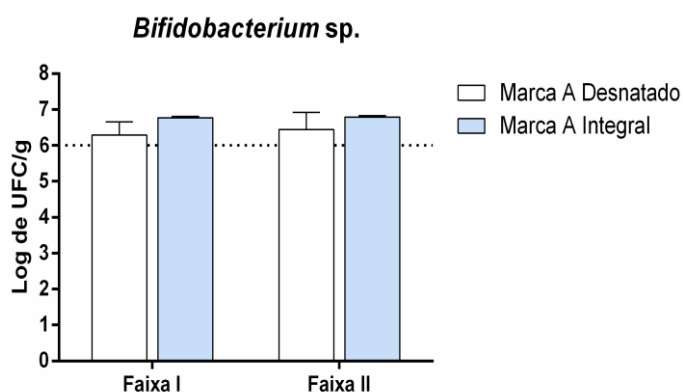


Figura 17: Médias e erro padrão das contagens de *Bifidobacterium* sp. em leite fermentado desnatado e integral do fabricante A com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II). A linha pontilhada representa a contagem recomendada pela legislação brasileira (BRASIL, 2002).

No presente estudo o teor de gordura nas diferentes faixas de pós fabricação (Faixa I e Faixa II) não apresentaram diferenças significativas na viabilidade de *Bifidobacterium* sp. no leite fermentado sabor morango da marca A.

Na revisão bibliográfica realizada não foram encontrados estudos que avaliaram a interferência da cultura *Bifidobacterium animalis. lactis* em relação ao teor de gordura de leites fermentados e iogurtes comerciais ou elaborados. Estudo de Vinderola e colaboradores (2000) observaram a viabilidade de *Bifidobacterium* de origem humana em iogurtes argentinos comerciais. Segundo o autor, o iogurte integral foi inibitório para cultura *B.bifidum* quando comparado ao iogurte com teor de gordura reduzido em contraste com relatado por Micanel e colaboradores (1997).

5.3.3.2 Influência do Teor de Gordura do Leite Fermentado na Recuperação de *S.thermophilus*

O presente estudo avaliou a contagem de *S.thermophilus* na amostra de leite fermentado probiótico sabor morango comercial denominado no estudo como marca A, nas diferentes faixas de pós fabricação (Faixa I e II).

Conforme observado na figura 18, o teor de gordura na amostra de leite fermentado de marca A, não influenciou significativamente a contagem de *S.thermophilus* em nenhuma das duas faixas (I e II) avaliadas.

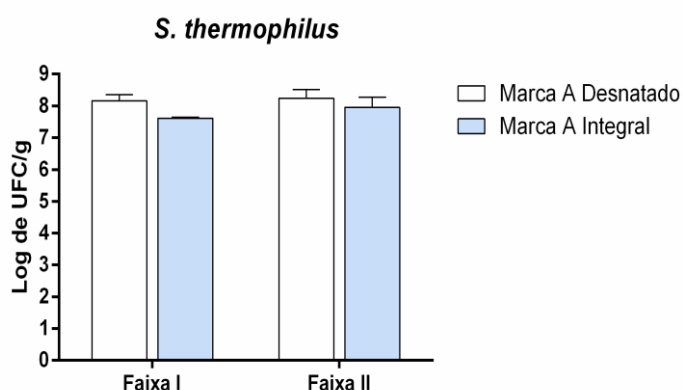


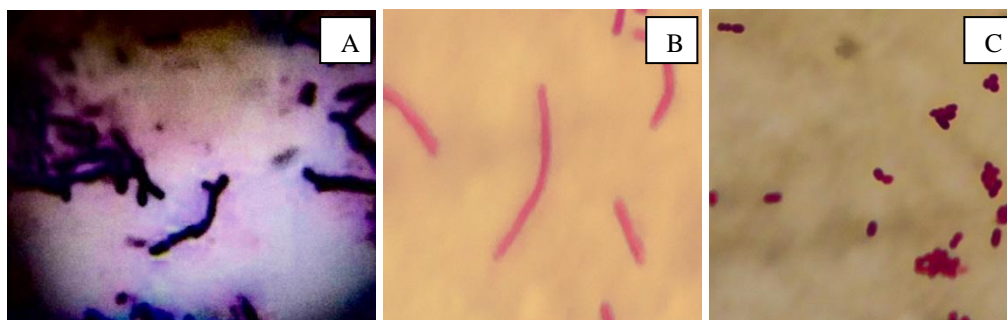
Figura 18: Médias e erro padrão das contagens de *S.thermophilus* em leite fermentado desnatado e integral do fabricante A com até 20 dias de fabricação (Faixa I) e 21 a 45 dias de fabricação (Faixa II).

Não foram observadas diferenças significativas na contagem de *S.thermophilus* em relação ao período de pós-fabricação tanto no leite fermentado integral quanto no desnatado.

Em relação a contagem de *Bifidobacterium* sp e *S.thermophilus* em leites fermentados probióticos comerciais o presente estudo concluiu que são escassos na literatura estudos relacionados a contagem desses microrganismos em relação ao teor de gordura (Integral e Desnatado) desses produtos. Na cidade do Rio de Janeiro, foi encontrado apenas uma marca de leite fermentado probiótico com a cultura *B.lactis* nos diferentes teores de gordura, sendo esse um possível motivo para ausência de estudos na literatura.

5.4 Confirmação das Colônias de *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. e *S.thermophilus* através do Método de coloração de Gram

As colônias representativas de cada meio seletivo foram confirmadas pela morfologia celular através de coloração pelo método de Gram e observadas no microscópio óptico (1000x) e comparadas com padrões existentes. Tais culturas podem ser observadas na Figura 19.



Fonte: autora

Figura 19: Fotomicrografia de *Bifidobacterium* sp.(A), *Lactobacillus* sp. (B) e *Streptococcus* (C) isolados da amostra de leite fermentado marca A por microscopia óptica (1000x).

5.5 Avaliação da Rotulagem das Marcas de Leites Fermentados Comerciais Analisadas

Nas três marcas de leites fermentados sabor morango contendo a cultura probiótica *Bifidobacterium* sp. os requisitos gerais de rotulagem estipulados pela RDC nº259/02 e RDC nº 360/03 foram verificados e estavam em acordo com o exigido.

As informações sobre denominação do fabricante, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação de origem, prazo de validade, identificação do lote, data de fabricação ou de validade e, quando necessário, as instruções de preparo do alimento são itens obrigatórios da RDC nº 259 (BRASIL, 2002a). No presente estudo, todas as marcas de leites fermentados estavam de acordo com tais informações exigidas pela legislação brasileira vigente. O mesmo não foi observado por Silva; Nascimento (2007), em uma avaliação de iogurtes comerciais, segundo o autor 70% das amostras estavam em desacordo na apresentação do lote.

Todos os rótulos avaliados apresentaram informações nutricionais agrupadas em um mesmo local em forma de tabela, obedecendo o modelo vertical A, aprovado pela RDC nº360/03.

Estudos realizados por Matta et al. (2006); Grandi; Rossi (2010); Garcia e colaboradores (2012), avaliaram a conformidade dos rótulos de iogurtes e bebidas lácteas e leites fermentados comerciais conforme suas informações nutricionais. Os autores também constataram conformidade dos produtos em relação a informação nutricional exigida pela RDC nº360/03.

A medida caseira foi apresentada por todas as três marcas de leites fermentados sabor morango. Esta medida serve para orientar o consumidor sobre a porção normalmente consumida, como fatias, unidades, potes, xícaras, copos e colheres de sopa. As marcas A e C especificaram em seus rótulos a medida caseira em “1 pote” já a marca B em “1 unidade”, ambas de acordo com a legislação RDC nº360/03.

Freitas et al.(2004), realizaram uma avaliação da percepção do consumidor em relação à rotulagem de produtos lácteos, foi constatado que as declarações do lote e da medida caseira foram as informações que menos apareceram nos rótulos dos produtos avaliados como iogurtes, requeijões e queijos. No mesmo estudo verificou-se que a declaração da informação nutricional apareceu na maioria dos rótulos, porém, em alguns casos, tal informação não se apresentava de acordo com o exigido pela RDC nº360/03 (GRANDI; ROSSI, 2010).

Em relação ao percentual dos valores diários (%VD) encontrados nos leites fermentados analisados, todos os rótulos apresentaram conformidade com esse item conforme exigido pela RDC nº 360/03. Esse valor (%VD) indica o quanto o produto em questão apresenta de energia e nutrientes em relação a uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ.

Além das informações de rotulagem exigidas pela RDC nº 259/02 e RDC nº 360/03, os produtos embalados devem cumprir a exigência da RDC nº 40/02 que determina a seguinte declaração no rótulo: “não contém glúten” ou “não contém glúten”. As três marcas de leites fermentados analisadas estavam em conformidade com essa legislação. Todas apresentaram a frase “não contém glúten” em seus rótulos. O mesmo foi observado pelo estudo de Garcia; Farias; Lima (2012), também realizado com leites fermentados probióticos comerciais.

Os leites fermentados são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas os leites fermentados que possuem alegação funcional, devem estar de acordo com as legislações da ANVISA (BRASIL, 2002b; BRASIL, 2008), por possuírem cultura probiótica ao leite fermentado, estes tornam-se alimentos funcionais, mas a declaração de propriedade funcional é de caráter opcional.

O fabricante que alegar propriedade funcional deve seguir as orientações de rotulagem conforme as legislações vigentes (BRASIL, 2002b; BRASIL, 2008).

As marcas de leites fermentados avaliadas, as marcas A, B e C apesar de conter a cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* não apresentaram alegação funcional ou qualquer expressão que induzisse a essa alegação. Tais marcas devem seguir a legislação vigente para leites fermentados (BRASIL, 2007), e por não apresentarem alegações no rótulo, apresentar apenas o nome do microrganismo utilizado.

Todas as marcas avaliadas no presente estudo encontravam-se em conformidade com as exigências da IN nº 46 (MAPA), os rótulos apresentaram as seguintes informações:

- Expressões "Leite Fermentado" ou "Leite Cultivado" ou "Leite Fermentado Natural" ou "Leite cultivado Natural"
- Com creme", "Integral" ou "Entero", "Parcialmente Desnatado" ou "Desnatado"
- Contagem viável de Bifidobactéria quando mencionadas nos rótulos
- Expressões "com açúcar" ou "açucarado" ou "adoçado"?

Conforme observado nos resultados anteriores, todas as marcas apresentaram contagem mínima (10^6 UFC/g) de *Bifidobacterium* sp. exigida pela legislação nacional (BRASIL, 2007) quando realizada análise com o diluente pré-reduzido que recuperou melhor a cultura probiótica presente nos leites fermentados avaliados. Todas as três marcas mencionaram a presença de cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* em seus rótulos.

6 CONCLUSÃO

Dentre os três meios de culturas avaliados, concluiu-se que o Ágar MRS adicionado de cisteína suplementado com antimicrobianos foi eficaz para o isolamento de *Bifidobacterium* sp. em leites fermentados. Foi observado uma melhor recuperação de *Bifidobacterium* sp. quando utilizado o diluente água peptonada pré-reduzida pois este contém ingredientes que protegem o microrganismos da injúria.

Dentre as amostras de leites fermentados sabor morango, concluiu-se que todas as três marcas apresentaram a cultura probiótica viável contendo o número mínimo exigido (10^6 UFC/g), quando as contagens foram realizadas utilizando-se diluente pré-reduzido, mas em apenas duas quando da utilização de diluente não reduzido.

A cultura bioajustadora *S.thermophilus* estava presente em todas as marcas de leites fermentados, com contagens acima de 10^7 UFC/g. Por outro lado, apenas a marca C apresentou a cultura bioajustadora *L. bulgaricus* que manteve contagem mínima de 10^7 UFC/g.

Todas as marcas de leites fermentados avaliados no presente estudo estavam em conformidade com as exigências gerais de rotulagem para produtos embalados e com a IN nº46 (BRASIL, 2007) específica para leites fermentados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A. C; RUBIO-TEIXEIRA, M; POLAINA, J. Lactose: The Milk Sugar from a Biotechnological Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.553-557, 2004.

AKALIN, A. S; UNAL, G; DINKCI, N; HAYALOGLU, A. A. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.7, p.3617-3628, 2012.

ANEKELLA, K; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 17-24, 2013.

ANNUNZIATA, A; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: a consumer perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 223-228, 2011.

ANNUNZIATA, A; VECCHIO. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v.28, n.1, p.348-355, 2013.

ANTUNES, L. A. F. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 6, n. 34, p. 30-34, 2001.

ARAÚJO, T.F; SANT'ANNA, M.D.S. L; RODRIGUES, C. V; COSTA, C. E; PAULA, H.A. A; TEIXEIRA, T. S. F. Avaliação do perfil de conformidade de diferentes leites fermentados com a legislação brasileira de alimentos. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66.p.40-45, 2011.

ARROYO, L; COTTON, L.N; MARTIN, J. H. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 29, p. 20-24, 1994.

ASHRAF, R; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.194- 208, 2011.

ATASSI, F; SERVIN, A. L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. **FEMS Microbiology letters**, v.304, p.29-38, 2010.

AUDISIO, M.C; OLIVER, G; APELLA, M.C. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. **Journal of Food Protection**, v.63, n.10, p.1333-1337, 2000.

BALDISSERA, A. C; BETTA, F. D; PENNA, A. L. B; LINDNER, J. D. D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1497-1512. 2011.

BARRETO, G. P. M; SILVA, N; SILVA, E. N. D; BOTELHO, L; YIM, D.K; ALMEIDA, C. G. D; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Brazilian Journal Food Technology**, v.6, n.1, p.119-126, 2003. BECH-LARSEN, T; GRUNERT, K. G. The perceived healthiness of functional foods: A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers perception of functional foods. **Appetite**, v. 40, p.9-14, 2003.

BEERENS, H; GAVINI, F; NEUT, C. Effect to exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. **Anaerobe**, v. 6, p. 65-67, 2000.

BENGMARK, S; GIL, A. Bioecological and nutritional control of disease: prebiotics, probiotics and synbiotics. **Nutricion Hospitalaria**, v. 21, n. 2, p. 73-86, 2006.

BERTAZZONI, E; DONELLI, G; MIDTVEDT, T; NICOLI, J; SANZ, Y. **Probiotics and clinical effects: is the number what counts?** v.25, n.4, p.193-212. 2013.

BIAVATI, B; VESCOVO, M; TORRIANI, S; BOTTAZZI, S. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications, **Annals of Microbiology**, v.50, p.117-131. 2000.

BISCAIA, F. M. I; STADLER, C.C; PILATTI, A. L. In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, XI, 2004, Bauru. **Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas**. São Paulo.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado Brasileiro**. 2005. 227f. Tese (Doutorado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2005.

BURFORD, M.Y. Enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in milk using oxygen-reducing membrane fraction. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 24, p. 21-23, 1989.

BURKERT, M, F. J; FONSECA, S, A, R; MORAES, O, J; SGANZERLA, J; KALIL, J, S; BURKERT, V, A. C. Aceitação sensorial de bebidas lácteas potencialmente simbióticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.4. 2012.

BRASIL. Lei nº8078, de 11 de setembro de 1990. Estabelece normas de proteção e defesa do consumidor. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 set.1990. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18078.htm. Acesso em: 17 mar.2015.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999a. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19782.htm. Acesso em: 10 abr. 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n.16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999b.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n.17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999c.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999d.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999e.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 259, de 20 de Setembro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 set. 2002a.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 2, de 07 de Janeiro de 2002b. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 09 jan.2002. Disponível em: <www.anvisa.org.br>. Acesso em: 10 mar. 2015.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº360, de 23 de dezembro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 dez.2003.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimento. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica 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. Atualizado julho de 2008. VIII-Lista das Alegações Aprovadas. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 21abril. 2015.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51, de 18 de Setembro de 2002. Adota os regulamentos técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2002.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites fermentados. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2007.

CAO, Y.C; FERNÁNDEZ, A. F. Probióticos y reflexión necesaria. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v.21, p. 3-4, 2005.

CASAROTTI, S. N; MONTEIRO, D. A; MORETTI, M. M. S; PENNA, A. L. B. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. **Food Research International**, v.59, p.67-75. 2014.

CHAMPAGNE, C. N. J; GARDNER, N. J. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Review in food science and nutrition**, v.45, p.61-84, 2005.

CHEN, M; MUSTAPHA, A. Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. **Food Microbiology**, v. 30, p.68-73, 2012.

COOK, T, M; TZORTZIS, G; CHARALAMPOPOULOS, D; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.162, p. 56-67. 2012.

COPPOLA, M. M; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, 336 p. 1297-1303. 2004.

CORTHESEY, B; GASKINS, H. R; MERCENIER, A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **The Journal of Nutrition**, v.3, p.781-790, 2007.

COX, A. J; PYNE, D. B; SAUNDERS, P. U; FRICKER, P. A. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v.4, n.44, p. 222-226, 2010.

CROSS, L.M. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.34, n.4, p. 245-253. 2002.

CRUZ, G. A; ANTUNES, C, E, A; FARIA, F, A, J; CHAVES, D, S, C, A; CARVALHO, D, J,M,L; SAAD, I, M, S. PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS EM ALIMENTOS- Fundamentos e aplicações tecnológicas. In: Leites Fermentados e iogurtes probióticos e prebióticos. São Paulo:Varela, ed.1,669p.

DAMIN, M. R; MINOWA, E; ALCANTARA, M. R; OLIVEIRA, M. N. Effect of the cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk fermented with probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v.39, p.40-55, 2008.

DE CARVALHO, L; KRUGER, K.G; BEHRENS, J; DESTRO, T, M; LANDGRAF, M; FRANCO, M, G, D, B, M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Technology**, v.42, p.491-495, 2009.

DE MAN, J.C; ROGOSA, M; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, 130–135, 1960.

DENIPOTE, F. G; TRINDADE, E. B. S. M; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.47, n.1, p.93-98. 2010.

ELIZAQUÍVEL, P; SÁNCHEZ, G; SALVADOR, A; FISZMAN, S; DUEÑAS,M.T; LÓPEZ,P; PALENCIA,F.P; AZNAR,R. Evaluation of yogurt and various beverages as carries of lactic acid bacteria producing 2- branched(1,3)- β -d-glucan. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.7, p.3271-3278, 2011.

FAVARO-TRINDADE, C.S; HEINEMANN, R. J. B; PEDROSO, D. L. Developments in probiotic encapsulation, *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources*, v.6, p. 1–8. 2011.

FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 206p, 2003.

FLESCH, T, G, A; POZIOMYCK, K. A; DAMIN, C, D, D. The therapeutic use of symbiotics. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.27, n. 3, 2014.

FLOCH, H. M. Recommendations for Probiotic Use in Humans- A 2014 Update. **Pharmaceuticals**, v.7, p. 999-1007. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANITAZATION (FAO). OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001): Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: [//ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf](http://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf). Acesso em: 11 de março de 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANITAZATION (FAO). OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002): Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso em 02 de Junho de 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANITAZATION (FAO). OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004): Guidance: interim procedures for qualified health claims in the labeling of conventional human food and human dietary supplements: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/dms/nutt-e.html>. Acesso em: 4 de Abril de 2015.

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

GAGGIA, F; MATTARELLI, P; BIAVATI, B. Probiotics and Prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.31, p.15-28. 2010.

GALLINA, D. A. Leites Fermentados: Funcionais–Tendências e Inovações. **Revista Ingredientes e Tecnologias**, v.3, n. 9, p.26-30, 2010.

GALLINA, A. D; SILVA, A. T. A; TRENTO, S. H.K; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.4, p.239-244.2011.

GARCIA, G.D; CARVALHO, M. A. R; DINIZ, C. G; MARQUES, J. L; NICOLI, J. R; FARIAS, L.M. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group strains recovered from broiler faeces. **British Poultry Science**, v. 53, n.1, p. 71-76, 2012.

GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES. 243-2003. Codex Standart for fermented milk. 2ed. Codex Alimentarius Commission, Belgium: 2010, 11p.

GHODDUSSI, H.B., ROBINSON, R.K., Enumeration of starter cultures in fermented milks. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 151–158, 1996.

GLEESON, M; NIEMAN, D.C; PEDERSEN, B. K. Exercise, nutrition and immune function. **Journal of Sports Sciences**, v. 22, n.1, p. 115-125. 2004.

GRANATO, D; BRANCO,F.G; CRUZ,G.A;FARIA,F. A. J; SHAH, P. N. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Institute of Food Technologists**, v.9, p. 455-470, 2010.

GRAND, M; KÜFEER, M; BAUMGARTNER, A. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 90-92, 2003.

GROSSO, C. R. F; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.151-156, 2004.

GUARINO, A; LO VECCHIO, A; CANANI, R. B. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p.18–23, 2009.

GUARNER, F; KHAN, A. G; GARISCH, J; ELIAKIM, R; GANGI, A; THOMSON, A; KRABSHUIS, J; MAIR, T. L. P. Probióticos e Prebióticos. **Revista Brasileira de Nutrição**, v.56, n. 6, p. 169-175, 2008.

GUYONNET,D;CHASSANY,O;DUCROTTE,P;PICARD,C;MOURETS,M;MERCIER,H.C; MATUCHANSKY,C.Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized,double-blind,controlled trial. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 475-486. 2007.

HAILU, G; BOECKER, A; HENSON, S; CRANFIELD, J. Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada: A conjoint study using probiotics. **Appetite**, v.52, p. 257-265, 2009.

HARMSSEN, H. J. M; GIBSON, G.R; ELFFERICH, P; RAANGS, G.C; WILDEBOER-VELOO, A.C; ARGAIZ, A; ROBERFROID, M. B; WELLING, G.W. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, 125–129, 1999.

HARTEMINK, R; DOMENECH, R.V; ROMBOUITS, F. M. LAMVAB-A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces F.M. **Journal of Microbiological Methods**, v.29, p. 77-84. 1997.

HATI S, MANDAL S, PRAJAPATI J. B. Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v.1, n.1, p.83-91. 2013.

HENNESSY, M. What's driving growth in functional food and beverages? A convergence of nutrition, convenience and taste. Disponível em: <<http://www.nutraingredients-usa.com/Markets/What-s-driving-growth-in-functional-food-and-beverages-A-convergence-of-nutrition-convenience-and-taste>. Acesso em: 10 de Março de 2015.

HOMAYOUNI, A; AZIZI, A; JAVADI, M; MAHDIPOUR, S; EJTAHED, H. Factors influencing probiotic survival in ice cream: A review. **International Journal of Dairy Science**, v. 7, n.1, p.1-10.2012

HUURRE, A; LAITINEN,K;RAUTAVAS;KORKEAMÄKI,M; ISOLAURIE.Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. **Clinical & Experimental Allergy**, v.38,p.1342-1348, 2008.

JANER, C; PELAEZ, C; REQUENA, T. Caseinomacropéptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk .**Food Chemistry**, v. 86, p. 263-267, 2004.

KAILASAPATHY, K; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Their therapeutic potential and survival in yogurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, n.52, p. 28-33, 1997.

KAILASAPATHY, K; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 80–88, 2000.

KLIJN, A; MERCENIER, A; ARIGONI, F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. **Microbiology Reviews**, v.29, p.491-509, 2005.

KOLOZYN-KRAJEWSKAA, D; DOLATOWSKI, Z. J. Probiotic meat products and human nutrition. **Process Biochemistry**, v.47, p. 1761-1772. 2012.

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

KRYSTALLIS, A; MAGLARAS, G; MAMALIS, S. Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods. **Food Quality and Preference**, v.19, n.6, p. 525-538, 2008.

LAGO, S. D. M. A. Avaliação do padrão de identidade e qualidade de leites fermentados probióticos. 2009.76f. Tese (Pós-graduação em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2009.

LARROIA, S; MARTIN, J. H. Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. **Cultured Dairy Products Journal**, v.26, p. 32-33,1991.

LEROY, F; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Food Science and Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

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

LOLLO, P. C; CRUZ, A. G; MORATO, P. N; MOURA, C. S; CARVALHO SILVA, L. B; OLIVEIRA, C. A. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 3549-3558, 2013.

LOURENS-HATTINGH, A; VILJOEN, C. B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p.1-17. 2001.

LOWER, C. E; PARKES, G. C; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice –myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p. 93-103, 2008.

MACARI, M; FURLAN, R. L. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 1, 2005, São Paulo: FACTA, 2005. 71p.

MACEDO, L. N; LUCHESE, R. H; GUERRA, A. F; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4. 2008.

MAIOCCHI, G; YOMO ABC: Functional food for consumers well-being and satisfaction. **Industria del Latte**, p. 94-98, 2001.

MARAFON, A. P; SUMI, A; GRANATO, D; ALCÂNTARA, R. M, TAMIME, Y, A; OLIVEIRA, N. M.Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. **Journal of Dairy Science**, v.94, n. 11, p. 5330-5340, 2011.

MARCO, L. M; TACHON, S. Environmental factors influencing the efficacy of probiotic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.24, p.207-213.2013

MARTARELLI, D; VERDENELLI, M. C; SCURI, S; COCCHIONI, M., SILVI, S; CECCHINI, C. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. **Current Microbiology**, v.62, p.1689–1696. 2011.

MCCOMAS, K. A; JR; GILLILAND, S. E. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. **Journal of Food Science**, v.6, n.68, p. 2090–2095, 2003.

MENEZES, A.C.S. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro de leite e polpa de cajá (Spondias mombin L.) com potencial atividade probiótica**. Recife, 2011.106p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MICANEL, N; HAYNES, I. N; PLAYNE, M. J. Viability of probiotic cultures in commercial Australian yogurts. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.52, p. 24-27, 1997

MIRANDA, O. R; NETO, G. G; FREITAS, R; CARVALHO, F. A; NERO, A. L. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. **Food Microbiology**, v.28, p.1509-1513. 2011.

MODLER, H. W; VILLA-GARCIA, L. The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. **Cultured Dairy Products Journal**, p.4-8, 1993.

MOHAMMADI, R; MORTAZAVIAN, M, A; KHOSROKHAVAR, R; CRUZ, G. A. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annual Microbiology**, v.61, p.411- 424, 2011.

MORAES, Fernanda P; COLLA, LUCIANE M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, Legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p. 109-122, 2006.

MORAIS, B, M; JACOB, A. M. C. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de pediatria**, v.82, n. 5. 2006.

MOSKOWITZ, H; BECKLEY, J; MINKUS-MCKENNA, D. Use of conjoint analysis to assess web-based communications on functional foods, **Appetite**, v.43, n.1, p. 85-92. 2004.

MOSELT, D. A. A; REES, M .G; BONANTS- VAN LAARHOVEN, A; LIGTENBERG-MERK, T. H; WERDLE, M. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 313-327, 1983.

MRIDULA, D; SHARMA, M. Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. **Food Science and Technology**, v.62, p. 482-487. 2015.

MUÑOZA, J. F; PARES, R. Selective Medium for isolation and Enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, p.1715-1718, 1988.

NICHOLS, A.W. Probiotics and athletic performance: A systematic review. **Current sports medicine reports**, v.6, p. 269-273, 2007.

NIVA, M; MAKELA, J. Finns and functional foods: Socio-demographics, health efforts, notions of technology and the acceptability of health-promoting foods. **International Journal of Consumer Studies**, v.31, p.34-35. 2007.

NOBAKHTI, A. R.; EHSANI, M. R.; MOUSAVI, S. M.; MORTAZAVIAN, A. M. Influence of lactulose and Hi-maize addition on viability of probiotic microorganisms in freshly made synbiotic fermented milk drink. **Journal Milchwissenschaft**, v.64, n.2, p.191-193. 2009.

NOGUEIRA, R. C. J; GONÇALVES, R. C. D. M. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.15, n.4, p.487-492, 2011.

NOONAN, W. P; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 19-24, 2004.

ODAMAKI, T; XIAO, J. Z; IWABUCHI, N; SAKAMOTO, M; TAKAHASHI, N; KONDO, S. Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 17, p.92-100, 2007.

OELSCHLAEGGER, A.T. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p. 57-62, 2010.

OLIVEIRA, M. N; SODINI, I; REMEUF, F; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p. 935-942. 2001.

OLIVEIRA, R. P. S; RODRIGUES, F. A. C; PEREGO, P; OLIVEIRA, M. N; CONVERTI, A. Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 22-27, 2011.

ONG, L; HENRIKSSON, A; SHAH, P.N. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v.16, n.5, p.446-456, 2006.

ONGGO, I; FLEET, G. H. Media for the isolation and enumeration of lactic acid bacteria from yoghurts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, p. 89–92, 1993.

ORDONEZ, J. A. O. RODRIGUEZ, M. I. C; ALVAREZ, L. F; SANZ, M. L. G; MINGUILLON, G. D. G. F; PERALES, L. H; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origen Animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 279p, 2005.

OUWEHAND, A. C; TOLKKO, S; KULMALA, J; SALMINE, S; SALMINE, E. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. **Letters in Applied microbiology**, v.31, p. 82-86, 2000.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, n. 29, p.4-8, 1974.

POSSEMIERS, S; MARZORATI, M; VERSTRAETE, W; WIELE, V. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 97–103. 2010.

PRASANNA, P. H. P; GRANDISON, A. S; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p. 247–262, 2014.

PRESCOTT, L. S; BJÖRKSTE, B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. **Journal Allergy Clinical Immunological**, v.120, n.2, p. 255-262. 2007.

RANADHEERA, S. C. D. R; BAINES, K. S; ADAMS, C. M. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, n.43, p.1-7. 2010.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-10, 2002.

ROESSLER, A; FRIEDRICH, U; VOGELSANG, H; BAUER, A; KAATZ, M; HIPLER, U.C. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.38, p. 93-102, 2008.

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.167-182. 2001.

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, **Lait**, v. 1, n.85, p. 39–56, 2005.

RYBKA, S; KAILASAPATHY, K. Media for the enumeration of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 839-850, 1996.

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

SAAD, N; DELATTRE, C; URDACI, M; SCHMITTER, M. J; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **Food Science and Technology**, v.50, p.1-16, 2013.

SAARELA, M; MOGENSEN, G; FONDÉN, R; MÄTTÖ, J; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p.197-215. 2000.

SALMINEN, S; NYBOM, S; MERILUOTO, J; COLLADO, C. M; VESTERLUND, S; EL-NEZAMI, H. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? **Current opinion in Biotechnology**, v.21, p.157-167, 2010.

SALOMÃO, J; WALTER, E. H. M; CARDOSO, L. C. D; BARROS, P E.B; LEITE, S. G. F. **Elaboração de sorvete de morango com características probióticas e prebióticas**. In. III CONGRESSO BRASILEIRO DE PROCESSAMENTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 25, 2013, Ilhéus.

SANDERS, M. E. Use of probiotics and yogurts in maintenance of health. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.42, p.71-74, 2008.

SANDERS, E, M; MARCO, L.M. Food Formats for Effective Delivery of Probiotics. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 65-85, 2010.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v.17, p.1284-1289, 2007.

SAXELIN, M; GRENOV, B; SVENSSON, U; FONDE, R; RENIERO, R; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of Probiotics. **Food Science & Technology**, v. 10, p.387-392, 1999.

SAXELIN, M; LASSIG, A; KARJALAINEN, H; TYNKKYNNEN, S; SURAKKA, A; VAPAATALO, H; JÄRVENPÄÄ, S; KORPELA, R; MUTANEN, M; HATAKKA, K. Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.293-300. 2010.

SODINI, I; LUCAS, A; TISSIER, J. P; CORRIEU, G. Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.15, n. 1, p.29-35. 2005.

SHAH, P. N. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p. 1262–1277, 2007.

SHARMA, M.; DEVI, M. Probiotics: A comprehensive approach toward health foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 4, p.537–552.

SHERMAN, M. P; OSSA, C. J; JOHNSON-HENRY; K. Unraveling Mechanisms of Action of Probiotics. **Nutrition in Clinical Practice**, v.24, n.1, p.10-14, 2009.

SILVEIRA, V. F. T; VIANNA, M. M. C; MOSEGUI, G. B, G. Brazilian legislation for functional foods and the interface with the legislation for other food and medicine classes: contradictions and omissions. **Revista de Saúde Coletiva**, v.19, n.4, p.1189-1202. 2009.

SIRÓ, I; KAPÓLNA, E; KAPÓLNA, B; LUGASI, A. Functional food: Product development, marketing and consumer acceptance-A review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467. 2008.

SPYROPOULOS, G.B; MISIAKOS, P. E; FOTIADIS, C; STOIDIS, N. C. Antioxidant Properties of Probiotics and Their Protective Effects in the Pathogenesis of Radiation-Induced Enteritis and Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.56, n.2, p.285-294. 2011.

STACKEBRANDT, E; RAINEY, F. A; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, actinobacteria classis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.47, n.2, p. 479- 491, 1997.

STRINGHETA, C. P; OLIVEIRA, T. T; GOMES, C. R; AMARAL, H. P. M; CARVALHO, F. A; VILELA, P. A. M. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.181-194. 2007.

SYBESMA, W; KORT, R; LEE, Y. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Science & Society**, v.33, n.4. p. 197-200. 2015.

TALWALKAR, A.I; KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v.5, p.1-8, 2004.

TERZAGHI, B. E; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, **Applied Microbiology**, v. 29, p. 807-813, 1975.

TESHIMA, E.D.S. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. Viçosa, 2001. 113 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa.

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

THARMARAJ, N; SHAH, P. N. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. **Journal Dairy Science**, v.86, p. 2288-2296. 2003.

TRIPATHI, K. M; GIRI, K. S. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v.9, p. 225-241. 2014.

URALA, N; LÄHTEENMAKI, L. Consumer's changing attitudes towards functional foods. **Food Quality and preference**, v.18. p. 1-12. 2007.

URNAU, D; CIROLINI, A; TERRA, N. N; CAVALHEIRO, P. C; MILANI, G, I, L; FRIES, M. L.L. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao ph ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto Lático Cândido Tostes**, v.67, n.384, p.5-10, 2012.

UTIYAMA, C.E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de leitões recém-desmamados**. Piracicaba, 2004. 110p. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

VAN KLEEF, E; VAN TRIJP, H; LUNING, P. Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. **Appetite**, v.44, n.3, p. 299-308, 2005.

VAN LOO, J A. E. Prebiotics Promote Good Health: The Basis, the Potential, and the Emerging Evidence. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.38, p.70-75. 2004.

VANDENPLAS, Y; HUYS, G; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v.91, p.6-21. 2015.

VERBEKE, W. Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 1, p. 45-5. 2005

VERNA, C. E; LUCAK, S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v.3, n.5, p.307-319. 2010.

VILJANEN, M; SAVILAHTI, E; HAAHTELA, T; JUNTUNEN-BACKMAN, K; KORPELA, R; POUSSA, T. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. **Allergy**, v.60, p. 494-500, 2005.

VINDEROLA, C. G; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v.9, n. 8, p.497-505, 1999.

VINDEROLA, C. G; BAILO, N; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, p. 97-102. 2000.

WALSTRA, P; WOUTERS, J.T; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. Buenos Aires. Boca Raton: 808p, 2006.

WARD, P; ROY, D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. **Lait**, v. 85, p. 23-32, 2005.

WU, Q. Q; YOU, J. H; AHN, J, H; KWON, B; JI, E, G.Changes in growth and survival of *Bifidobacterium* by coculture with *Propionibacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n.1, p. 65-72, 2012.

XIAO, J. Z; KONDO, S; YANAGISAWA, N; TAKAHASHI, N; ODAMAKI, T; IWABUCHI, N. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 36, p. 1425-1435, 2006.

YERLIKAYA, O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. **Food science and Technology**, v.34, n. 2, p. 221- 229. 2014.

YONEZAWA, S; XIAO, J. Z; ODOMAKI, T; ISHIDA, T; MIYAJI; YAMADA, A;YAESHIMA; IWATSUKI, K. Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies lactis. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1815-1823, 2010.

ZHAO, X. H; LI, D. A new approach to eliminate stress for two probiotics with chemicals in vitro. **European Food Research and Technology**, v. 277, p.1569-1574, 2008.