

Universidade Camilo Castelo Branco
Campus de Fernandópolis

ELISANDRA DE MELLO DÉO

CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS PRESENTES EM LEITES FERMENTADOS

CONCENTRATION AND VIABILITY OF LACTIC ACID BACTERIA PRESENT
IN FERMENTED MILK

Fernandópolis, SP
2016

ELISANDRA DE MELLO DÉO

CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS
PRESENTES EM LEITES FERMENTADOS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dora Inés Kozusny-Andreani

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Camilo Castelo Branco, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Fernandópolis, SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

D465c Déo, Elisandra de Mello
Concentração e viabilidade das bactérias ácido lácticas
presentes em leites fermentados / Elisandra de Mello Déo.--
Fernandópolis, 2016
66f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais, da Universida-
de Brasil, como complementação dos créditos necessários
para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Dora Inês Kozusny-Andreani

1. Probióticos. 2. Vida de prateleira. 3. PH. 4. Tempera-
tura de conservação. I. Título.

CDD 637.146

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da UNICASTELO e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a UNICASTELO a disponibilizar através do site <http://www.unicastelo.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS PRESENTES EM LEITES FERMENTADOS”**

Autor(es):

Discente: Elisandra de Mello Déo

Assinatura: _____

Orientadora: Dora Inés Kozusny-Andreani

Assinatura: _____

Data: 19/setembro/2016

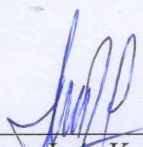
Universidade Camilo Castelo Branco • unicastelo.edu.br

TERMO DE APROVAÇÃO

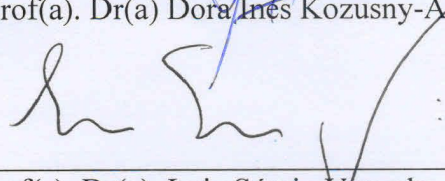
ELISANDRA DE MELLO DÉO

CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS PRESENTES EM LEITES FERMENTADOS.

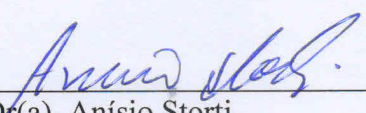
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Camilo Castelo Branco, pela seguinte banca examinadora:



Prof(a). Dr(a) Dora Inés Kozusny-Andreani (Presidente)



Prof(a). Dr(a). Luiz Sérgio Vanzela



Prof(a). Dr(a). Anísio Storti

Fernandópolis, 19 de setembro de 2016.

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a). Dora Inés Kozusny-Andreani

Universidade Camilo Castelo Branco • unicastelo.edu.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças quando eu mais precisei.

A minha família, em especial aos meus pais “José e Antônia”, por acreditarem em mim.

Ao meu esposo Sérgio Déo, pelo amor, paciência e por estar sempre ao meu lado, me apoiando em qualquer que seja a minha decisão.

A minha orientadora prof^a. Dr^a. Dora Inés Kozusny-Andreani, pela sua sabedoria e disposição em orientar esta pesquisa. Te admiro muito!

Aos professores do curso de mestrado em Ciências Ambientais por compartilharem o conhecimento e a coordenação do curso pela oportunidade, Prof. Dr. Luiz Sérgio Vanzela, muito obrigada!

CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRESENTES EM LEITES FERMENTADOS

RESUMO

Atualmente, a população além de buscar alimentos com qualidade nutricional, também procura produtos com efeitos benéficos a sua saúde. O consumo de alimentos probióticos tem como função o estabelecimento de uma microbiota que contribui para a atividade saudável do intestino e inúmeros outros benefícios à saúde humana. Para isso, é necessário que as bactérias estejam viáveis nesses alimentos durante a vida de prateleira, assim o leite fermentado possui data de vencimento menor que os produtos convencionais, muitas vezes, este produto é armazenado fora da temperatura indicada e até mesmo consumido após o prazo de validade, o que pode diminuir suas propriedades. Objetivou-se neste estudo avaliar a concentração de bactérias lácticas presentes no leite fermentado, sua vida útil e viabilidade como probióticos em duas temperaturas de conservação. Para isso, foram utilizadas doze marcas de leites fermentados, as quais foram analisadas por meio de cultivo microbiológico em meio Man Rogosa & Sharpe, mantidos em temperaturas de 5° C e 15° C, por um período de oito semanas, das quais cinco semanas corresponderam ao prazo de validade e três fora do prazo de validade. As avaliações foram realizadas, semanalmente, quanto ao pH e à determinação de células viáveis das bactérias lácticas. Pelos resultados obtidos, foi possível observar que algumas marcas de leite fermentado apresentam concentrações de bactérias lácticas inferiores as recomendadas pela legislação e que a temperatura de conservação, o pH e o tempo de prateleira influenciam diretamente na viabilidade das bebidas lácteas probióticas.

Palavras-chave: Probióticos, vida de prateleira, pH, temperatura de conservação

CONCENTRATION AND VIABILITY OF LACTIC ACID BACTERIA PRESENT IN FERMENTED MILK

ABSTRACT

Nowadays population searchers for either nutritional quality food and health benefits. The consumption of probiotics has as a mainly function to establish the microbiota that contributes to a healthy intestine activity and several benefits to human health. Thereunto, it's necessary that bacteria are viable in those foods during their shelf time, so fermented milk has expiration date shorter than conventional products and many times, they are stored out of the specified temperature and even consumed after expiring. This paper aims to evaluate the concentration of milky bacteria present in fermented milk, their life cycle and viability with probiotics under two different conservation temperatures. That way, twelve different fermented milk brands were used, which were all analyzed by microbiological culture in vehicle Man Rogosa & Sharpe kept under 5° C and 15° C temperatures, through a period of eight weeks, in which five of them corresponded to expiration date and three of them correspond to a period out of the expiration time. The evaluations were performed weekly, when the pH and the determination of milk bacteria viable cells were possible. From data collected, it was possible to notice that some fermented milk bands showed milk bacteria concentrations lower than recommended by legislation and also the conservation temperature, pH and shelf time influence directly to viability of probiotic milk beverages.

Key-words: Probiotics, shelf time, pH, storage temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O intestino humano.	26
Figura 2: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 1 e 2 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	45
Figura 3: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 3 e 4 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	46
Figura 4: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 5 e 6 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	46
Figura 5: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 7 e 8 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	47
Figura 6: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 9 e 10 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	47
Figura 7: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 11 e 12 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	48
Figura 8: Distribuição do pH nas marcas 1 e 2 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	52
Figura 9: Distribuição do pH nas marcas 3 e 4 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	53
Figura 10: Distribuição do pH nas marcas 5 e 6 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	53
Figura 11: Distribuição do pH nas marcas 7 e 8 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	54
Figura 12: Distribuição do pH nas marcas 9 e 10 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	54
Figura 13: Distribuição do pH nas marcas 11 e 12 em ambas temperaturas e ambos os períodos.....	55
Figura 14: Distribuição do pH na temperatura de 5 °C considerando o tempo durante o prazo de validade de todas as marcas avaliadas.....	58
Figura 15: Distribuição do pH na temperatura de 15 °C considerando o tempo durante o prazo de validade de todas as marcas avaliadas.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alimentos funcionais, suas fontes e funções, reconhecidos no Brasil.	17
Tabela 2: Espécies de <i>Lactobacillus</i> mais utilizadas como probióticos.....	21
Tabela 3: Espécies de <i>Bifidobacterium</i> utilizadas com maior frequência como probióticos.....	21
Tabela 4: Valores mínimos de microrganismos específicos em produtos lácteos de acordo com normativas brasileiras.....	23
Tabela 5: Estatísticas descritivas da viabilidade das BAL de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada.	40
Tabela 5. Estatísticas descritivas da viabilidade das BAL de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada (continuação).....	41
Tabela 5. Estatísticas descritivas da viabilidade das BAL de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada (continuação).....	42
Tabela 6: Viabilidade das bactérias lácticas conservadas a 5°C e 15°C em relação às marcas avaliadas durante o prazo de validade.	49
Tabela 7: Estatísticas descritivas do pH de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada.....	50
Tabela 8: Estatísticas descritivas do pH nas temperaturas de 5° C e 15° C em relação às marcas avaliadas durante o prazo de validade.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFC	Unidades formadoras de colônias
mL	Mililitro
BAL	Bactérias ácido lácticas

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	13
1.1- Objetivo geral	15
1.2- Objetivos específicos	15
2- ALIMENTOS FUNCIONAIS	16
2.1- Leites fermentados.....	18
2.2- Probióticos	20
2.3- Função dos probióticos	23
2.4- Microbiota intestinal.....	25
2.5- Disbiose intestinal	29
2.6- Efeitos benéficos dos probióticos.....	30
2.6.1- Diarreia.....	31
2.6.2- Intolerância à lactose	32
2.6.3- Sistema imunológico	32
2.6.4- Síndrome do intestino irritável.....	33
2.6.5- Constipação intestinal	33
2.6.6- Obesidade.....	34
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1- Leites fermentados.....	36
3.2- Análise da viabilidade de bactérias ácido lácticas.....	36
3.3- Determinação do pH de leites fermentados	37
3.4- Análise estatística	37
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5- CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1- INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, a população atual está cada vez mais a procura de alimentos nutritivos e de qualidade, aliados aos efeitos benéficos à saúde. Esses efeitos, no que se refere ao hospedeiro, são conhecidos há muito tempo, apesar disso, os estudos desses alimentos, conhecidos como alimentos funcionais, e de seus componentes, responsáveis pelas características probióticas, intensificaram-se apenas nos últimos anos. Um alimento pode ser considerado funcional se for possível demonstrar que ele possui um efeito benéfico sobre uma ou várias funções específicas do organismo, que vai além das funções nutricionais habituais, melhorando o estado geral da saúde ou diminuindo o risco do desenvolvimento de alguma doença [1].

Os probióticos são suplementos alimentares que contêm bactérias vivas que produzem benefícios no hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal. No entanto consideram-se que são culturas únicas ou mistas de microrganismos que, consumidos por humanos, favorecem o incremento das propriedades da microbiota nativa [2].

De acordo com Pinto [3], os probióticos mais comuns (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) são empregados em alimentos industrializados, como nos produtos lácteos fermentados e também encontrados na forma de pó ou cápsulas.

Segundo Gon [1], os *Lactobacillus casei* são as bactérias probióticas mais utilizadas na fabricação de produtos lácteos, como em especial nos leites fermentados, devido ao seu alto poder de sobrevivência e multiplicação na microbiota intestinal, após sua ingestão, garantindo efeito favorável ao indivíduo que o consumiu. Algumas culturas probióticas devem ser utilizadas em pequenas quantidades na produção de leites fermentados, pois esses microrganismos podem produzir substâncias que provocam sabores indesejáveis ao produto final.

Nóbrega [2], descreve que as bactérias probióticas dos alimentos funcionais precisam fixar-se na parede do intestino para possuírem efeito terapêutico no organismo. Para isso, é necessário que essas bactérias estejam viáveis nos alimentos durante a vida de prateleira e ainda sejam ingeridas regularmente para que se tenha o efeito desejado.

Segundo Wang et al. [4], o leite fermentado contendo probióticos pode contribuir para melhora da saúde intestinal e pode ter um efeito positivo sobre a imunidade, mediada por células de animais hospedeiros. O consumo diário deste tipo de alimento pode aumentar significativamente as populações de bifidobactérias e lactobacilos presentes no intestino do hospedeiro. Além disso, são os principais componentes prováveis na alteração da imunidade, pois foi demonstrado que os *Lactobacillus acidophilus* possuem potente efeitos imunorreguladores.

De acordo com Patel e DuPont [5], os probióticos alteram a flora intestinal através do mecanismo antimicrobianos diretos, ou seja, o aumento da integridade da barreira mucosa, e modulação imune. Restaura o equilíbrio da flora intestinal pela introdução de microrganismo para prevenção de doenças e o tratamento pode ser benéfico para a saúde humana. Essas bactérias probióticas têm sido incluídas em inúmeros tratamentos clínicos e até mesmo preventivos, como diarreia infecciosa e para a prevenção de diarreia associada a antibióticos, a terapia e a prevenção de doenças inflamatórias do intestino, síndrome do intestino irritável, prevenção por radiação ou induzida por quimioterapia, enterocolite necrosante, encefalopatia hepática, dentre outros. A flora intestinal humana desempenha um papel importante à saúde humana, e a modulação da microbiota intestinal pode ser utilizado para tratar e prevenir uma variedade de doenças.

A microbiota intestinal pode ser considerada como um órgão vital, que transporta metabólitos essenciais e que desempenha funções protetivas, estruturais e histológicas, auxiliando na manutenção da homeostase corporal, sendo assim, se faz necessário mantê-la saudável [6].

Os probióticos têm sido incorporados nos mais diversos alimentos, devido aos seus vários efeitos benéficos, como em destaque nos leites fermentados. Porém, ainda existem diversos problemas com relação à resistência das culturas probióticas e à viabilidade desses alimentos, devido ao armazenamento em temperaturas impróprias e até mesmo consumo fora do prazo de validade [7]. O que justifica a realização desse estudo, no qual a análise da viabilidade de bactérias probióticas será comparada a cultura em diferentes períodos, conforme a data de validade indicada no rótulo da embalagem e também os tipos de temperaturas durante o armazenamento.

1.1- Objetivo geral

Analisar a concentração de bactérias ácido lácticas (BAL) presentes nos leites fermentados, tempo de vida útil e sua viabilidade como probióticos.

1.2- Objetivos específicos

- Quantificar a concentração de bactérias lácticas presentes nos leites fermentados de várias marcas,
- Analisar a vida útil dos microrganismos presentes nos leites fermentados, conforme a data de validade indicada no rótulo da embalagem e também os tipos de temperaturas durante o armazenamento.
- Avaliar o pH com a finalidade de relacionar com a viabilidade das BAL.
- Verificar a viabilidade como probióticos desses produtos lácteos.

2- ALIMENTOS FUNCIONAIS

Funcionalidade é a propriedade dos alimentos que vai além de sua qualidade de fonte de nutrientes. O conceito de alimento funcional é conhecido há muito tempo. Apesar disso os estudos desses alimentos e de seus componentes, intensificaram-se apenas nos últimos anos [8].

Nos últimos anos, o consumo de alimentos funcionais vem se intensificando cada vez mais como resultado de uma preocupação individual com saúde. No entanto, vários alimentos não possuem ação comprovada cientificamente, devido a variedade de oferta de alimentos e a quantidade de etapas avaliações para que determinado componente tenha o seu efeito comprovado [8].

Um alimento pode ser considerado funcional se for possível demonstrar que ele possui um efeito benéfico sobre uma ou várias funções específicas do organismo, que vai além das funções nutricionais habituais, melhorando o estado geral da saúde ou diminuindo o risco de desenvolvimento de alguma doença. O alimento deve possuir em sua composição, uma ou mais substâncias capazes de agir no sentido de modular os processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar dos indivíduos e prevenindo o aparecimento de algumas doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade. Lembrando sempre que esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção e prevenção da saúde e não à cura de certas doenças [9].

As doenças crônicas que mais preocupam a população são todas associadas com a alimentação: câncer, obesidade, hipertensão arterial e as doenças cardiovasculares. Assim, muitas dessas patologias podem ser prevenidas com o consumo diário de certos alimentos funcionais, ou ainda, aos que já apresentam a doença, podem reduzir danos consequentes [9].

O conceito de alimentos funcionais hoje adotado é o da legislação brasileira, que considera propriedade funcional “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo e

alegação de propriedade de saúde aquele que sugere, afirma ou implica a existência de relação entre alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde” [10].

Em alguns países como, por exemplo, o Japão a legislação reconhece como alimentos benéficos a saúde os seguintes compostos: Fibra alimentar da dieta, colinas, bactérias acidoláticas, minerais, ácidos polinsaturados, também a adição de outros mais, como peptídios e proteínas, oligossacarídeos, isoprenóides e vitaminas [8].

Na tabela 1 são apresentados alguns exemplos de alimentos funcionais e suas funções reconhecidos no Brasil.

Tabela 1: Alimentos funcionais, suas fontes e funções, reconhecidos no Brasil.

Nutrientes	Fontes	Funções
Ácido graxos Ômega-3 e 6	Peixes, algas marinhas Óleos(soja, girassol, oliva)	-Intervenção na coagulação do sangue. -Controle de processos inflamatórios.
Alicina Aliina Sulfato de dialina	Alho	-Redução do colesterol. -Função hipotensora. -Função fibrinolítica e anticoagulante.
Fibra alimentar Amido	Cereais (aveia, pão). Verduras crucíferas (repolho, brócolis, couve-de-bruxelas). Leguminosas (feijão, vagem, lentilha).	-As fibras dos cereais previnem doenças cardiovasculares. -As verduras protegem contra o câncer de cólon e de reto. -O amido presente em cereais e leguminosas previne o câncer de cólon e reduz o colesterol.
Bactérias benéficas (PROBIÓTICOS)	Bebidas lácteas com lactobacilos (leite fermentado) Bifidobactérias (iogurtes)	-Aumento da resistência a infecções. -Impedimento da colonização por bactérias patogênicas. -Redução do colesterol.
Fitoestrogênios Isoflavonas Lignanas	Leguminosas (feijão e soja) Cereais	-Redução do estrogênio, atuando na prevenção do câncer de mama
Flavonóides	Vinho tinto Uva	-Antioxidantes -Inibição da formação de ateromas
Vitaminas A, C, E Betacaroteno Mineral selênio	Frutas (caqui, mamão, laranja, limão, acerola) Hortaliças (beterraba, espinafre, cenoura, tomate, brócolis, repolho) Ovos e cereais	-Antioxidantes

Fonte: Arabbi. [11], 1999.

Os alimentos funcionais correspondem a 5 a 7% do mercado mundial de alimentos. Há uma grande demanda por novos produtos e paralelamente uma dificuldade da efetiva comprovação da eficácia do consumo desses tipos de alimentos.

Por outro lado, nosso país é tão rico em alimentos naturais e ainda inexplorados. Assim cabe a nós, profissionais de saúde, a árdua tarefa de dirigir pesquisas que possam identificar e comprovar a eficácia e viabilidade de novos produtos e de outros já existentes como o leite fermentado, para garantir a população os benefícios e a proteção de possíveis riscos de sua utilização [8].

2.1- Leites fermentados

Denominado doce (pH entre 6 e 7), o soro de queijo, é considerado um produto secundário da indústria queijeira, é o produto final do processo de coagulação enzimática do leite [12]. O soro além de representar cerca de 85 a 95 % do volume do leite empregado inicialmente na fabricação de um queijo, contém quase 55 % do total de nutrientes do leite, portanto é considerado uma grande fonte de lactose, cálcio, proteínas e vitaminas hidrossolúveis.

Segundo Gerhardt et al.[13], ultimamente o soro retirado da fabricação do queijo é reconhecido pelas inúmeras propriedades nutricionais e funcionais, não somente pelas proteínas de alto valor biológico, mas também pela grande quantidade de aminoácidos sulfurados presentes nas proteínas do soro.

Umas das alternativas para as indústrias seria a conversão do soro extraído em bebidas lácteas fermentadas, diminuindo os problemas ocorridos com o seu descarte, além de reduzir custos, principalmente, pela facilidade e simplicidade do processo, devido à possibilidade de uso dos próprios equipamentos já presentes na fábrica de beneficiamento de leite [14].

As bebidas lácteas são um tipo de leite fermentado que vem se destacando como grande substituto do iogurte, sendo utilizados leite reconstituído ou leite e/ou derivados de leite, como neste caso o soro extraído da fabricação do queijo. Portanto, a proporção do leite e do soro ainda não é bem definida [13].

Segundo Thamer e Penna [14], as bebidas lácteas fermentadas são resultantes da mistura do leite e do soro de leite, adicionado a substâncias

alimentícias ou não, a fermentação ocorre mediante a ação de cultivo de bactérias específicas. A base láctea deve conter pelo menos 51% do total de ingredientes do produto final.

De acordo com a composição geral, as bebidas lácteas fermentadas contêm grandes propriedades nutricionais, devido à composição do leite a partir das quais foram fabricadas, além das alterações na concentração de alguns constituintes químicos, devido ao processo de fermentação e à tecnologia de fabricação aplicada [15].

As indústrias de laticínios têm explorado bastante os microrganismos probióticos, como ferramenta para criação e lançamentos de novos produtos funcionais. Estas culturas de bactérias probióticas são utilizadas, por serem capazes de aderir à mucosa intestinal e também por serem resistentes aos ácidos e a bile [16].

Diversas cepas de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* têm sido comumente utilizadas na fabricação de bebidas lácteas fermentadas. Atualmente estas culturas probióticas são denominadas ABT (*acidophilus bifidus-thermophilus*), que contém *L. acidophilus*, bifidobactéria e *S. thermophilus*, sendo que estes microrganismos devem tolerar o processo de elaboração do bioproduto, e também manter a viabilidade celular das cepas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* durante o armazenamento [13].

Atualmente a fabricação dos produtos lácteos fermentados são intensamente influenciados pelas cepas utilizadas, sendo possíveis excelentes resultados sensoriais, durante a formulação destas bebidas lácteas fermentadas probióticas [16].

Segundo Cunha et al. [16], o uso de soro de leite associado à fermentação por bactérias probióticas, quando administrados nas quantidades certas, trazem inúmeros benefícios à saúde, além de contribuir com novas alternativas alimentares nutritivas.

2.2- Probióticos

Sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida” o termo probiótico deriva do grego e denominado “pró-vida”. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes definições. Já foram utilizados para denominar substâncias secretadas por um protozoário que estimularam o crescimento de outros, e também para suplementos alimentares para animais, incluindo bactérias e substâncias que auxilia no equilíbrio da microbiota intestinal [17].

De acordo com Brancher [18], o probiótico é caracterizado por ser uma preparação ou um produto que contém bactérias lácticas vivas benéficas e outras bactérias como de gênero Bifidobactérias ou leveduras aplicadas como células secas ou em produto fermentado, podendo ser culturas puras ou mistas, que ao ser consumido na quantidade adequada contribui para saúde intestinal do indivíduo. São comercializados na forma de preparações naturais (leite fermentado ou iogurte) ou farmacêuticas (cápsulas ou sachês).

Segundo Naves [17], os produtos probióticos tem uma grande influência benéfica sobre a flora intestinal humana, incluindo fatores como efeitos antagônicos, competição e imunológicos, resultando em uma maior resistência contra bactérias patogênicas. Sendo assim, a utilização destas culturas probióticas, multiplicam as bactérias benéficas, o que pode restringir a proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais à saúde, além de melhorar os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. De acordo com Machado [19], os gêneros probióticos mais destacados são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. *Lactobacillus*: é o gênero normalmente predominante no intestino delgado. São bactérias anaeróbias facultativas. Das mais de 100 espécies, as mais utilizadas como probióticos são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Espécies de *Lactobacillus* mais utilizadas como probióticos.

Espécies de <i>Lactobacillus</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 271	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	<i>Lactobacillus jensenii</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAI	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Fonte: PASCHOAL, et al.[20], adaptada pelo autor.

Bifidobacterium: são bactérias normalmente aeróbicas estritas ou anaeróbicas, que predominam no intestino grosso. Das mais de 30 espécies de bifidobactérias, as frequentemente usadas como probióticos estão apresentadas na tabela 3 [20]:

Tabela 3: Espécies de *Bifidobacterium* utilizadas com maior frequência como probióticos.

Espécies de <i>Bifidobacterium</i>	
<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>

Fonte: PASCHOAL, et al.[20], adaptada pelo autor.

A ingestão regular de probióticos promove vários benefícios para a saúde do hospedeiro, como: tornar o meio intestinal desfavorável ao crescimento de microrganismos patogênicos e ajudar na destruição dos mesmos; reduzir a

concentração sanguínea de lipídios; agir como imunomoduladores; reduzir a gordura corporal (visceral e subcutânea), índice de massa corporal (IMC), à sensibilidade à insulina e à inflamação. No entanto, de acordo com Correia e Percegoni [21], estes microrganismos, devem necessariamente, sobreviver às condições ácidas do estômago e da bile, ser capaz de aderir à mucosa intestinal e de colonizar o intestino, mesmo que transitoriamente.

Várias espécies de *Lactobacilos* foram avaliadas como uma abordagem probiótica em modelos experimentais de obesidade e em seres humanos. Cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* spp reduziram o tamanho dos adipócitos e células de gordura corporal em ratos alimentados com dieta rica em gordura [22].

São de suma importância as informações sobre as preparações probióticas. Para que um microrganismo possa ser utilizado como probiótico, devem ser realizados vários estudos prévios para avaliar sua eficácia. Portanto, é preciso verificar sua resistência ao ácido e à bile, sua capacidade de aderir à mucosa, sua atividade antimicrobiana e sua ação imunomoduladora. É relevante também adquirir informação a respeito da concentração do(s) probiótico(s) na data final de validade do produto, visto que, ao longo da validade do produto, a concentração de bactérias tende a diminuir [3].

Segundo Menezes et al.[7], os microrganismos probióticos têm sido incorporados nos mais diversos alimentos, devido aos seus vários efeitos benéficos, como em destaque nos leites fermentados. Porém, ainda existem diversos problemas com relação à resistência das culturas probióticas e à viabilidade desses alimentos.

É necessário, que as bactérias probióticas permaneçam viáveis no alimento durante sua vida útil, estando presente em número expressivo e viável no momento do seu consumo, que de acordo com Oliveira et al. [23], a concentração recomendada é de 6 a 8 Log UFC ml⁻¹ (Unidades formadoras de colônias). Outros autores sugerem que para garantir os efeitos benéficos, os produtos probióticos devem conter a concentração mínima de 7 a 9 log UFC mL⁻¹.

Nóbrega [2], afirma que os *Lactobacillus casei* só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem 10⁹ UFC/mL, número mínimo para contribuir significativamente para uma microbiota intestinal saudável. Assim,

considerando um consumo de produtos lácteos de 100 mL, estes devem conter pelo menos 10^9 UFC mL⁻¹ de bactérias probióticas viáveis no momento do consumo do produto.

De acordo com as normativas brasileiras [24], define-se por leites fermentados os 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. Contagem de microrganismos específicos deverão cumprir os requisitos considerados na Tabela 4 abaixo durante seu período de validade.

Tabela 4: Valores mínimos de microrganismos específicos em produtos lácteos de acordo com normativas brasileiras.

Produto	Contagem de bactérias lácticas totais (ufc/ml) Norma FIL 117A: 1988	Contagem de leveduras específicas (ufc/ml) Norma FIL 94 B: 1990
Iogurte	mín. 10^7	-
Leite cultivado ou fermentado	mín. 10^6	-
Leite acidófilo ou acidofilado	mín. 10^7	-
Kefir	mín. 10^7	mín. 10^4
Kumys	mín. 10^7	mín. 10^4
Coalhada	mín. 10^6	

Fonte: BRASIL [24], adaptada pelo autor.

Já no caso de utilização das bifidobactérias, a contagem será de no mínimo 10^6 UFC/ml de bifidobactérias g⁻¹.

A legislação também determina que as bebidas lácteas não deverão ser submetidas a qualquer tratamento térmico após a fermentação, pois as bactérias utilizadas devem ser viáveis e ativos e estar em concentração igual ou superior àquela definida na tabela 4 no produto final e durante seu prazo de validade [24].

2.3- Função dos probióticos

Em 1908, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, foi para um grande cientista russo Elie Metchnikof, o qual se dedicou à observação e à comprovação do valor

dos probióticos incluídos na alimentação e sua relação com a qualidade de vida e saúde humana. Analisando uma pequena população camponesa no interior da Bulgária (região dos Balcãs) que conseguiram atingir alta longevidade com um menor índice de morbidade, verificou que a diferença desta população sobre outras de regiões próximas era a ingestão de leites fermentados. A partir disso, avaliou bactérias presentes nestes produtos lácteos, chamadas *Lactobacillus bulgaricus* e futuramente utilizou cepas destes mesmo microrganismos, como forma de tratamento para pacientes com doenças renais e hepáticas terminais, obtendo grande sucesso [25].

Dai em diante, os estudos desses alimentos, conhecidos como alimentos funcionais, e de seus componentes como as bactérias lácteas, responsáveis pelas características probióticas, intensificaram-se nos últimos anos. Sendo comprovado que estes microrganismos possuem um efeito benéfico sobre uma ou várias funções específicas do organismo, que vai além das funções nutricionais habituais, melhorando o estado geral da saúde ou diminuindo o risco do desenvolvimento de alguma doença [1].

Segundo Ewaschuk e Dielerman [26], estes microrganismos probióticos são fundamentais para equilíbrio da nossa saúde, devido às suas inúmeras funções como:

- **Função nutricional:** formação de vitaminas do complexo B e vitamina K (sendo essencial para o pool destas vitaminas no organismo).
- **Função digestória:** produção das enzimas digestivas, principalmente da enzima lactase, proteases e peptidases. Melhora o trânsito intestinal e também a absorção de vários nutrientes;
- **Função cardiovascular:** auxilia na diminuição dos níveis de colesterol plasmáticos;
- **Função metabólica:** os microrganismos probióticos liberam ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, que servem como substrato metabólico para as células do cólon, fornecendo, condições ideais, 40-50% da energia requerida. Além de produzirem enzimas citocromo P450-like, que instigam a expressão gênica do citocromo no fígado, o que favorece ao órgão hepático uma desintoxicação; impedem a ressíntese de hormônios já degradados e convertem muitos flavonoides às suas formas ativas. Algumas culturas de bactérias que após consumidas,

produzem substâncias que auxiliam, na metabolização de medicamentos, hormônios, carcinógenos, metais tóxicos e outros xenobióticos, devido seu efeito inibitório sobre enzima HMG-CoA redutase, que também por sua vez, reduz da produção do colesterol [26].

- **Função imunomoduladora:** estes microrganismos patogênicos são fundamentais para o melhor desenvolvimento e a maturação dos sistemas imunológico entérico e sistêmico, uma vez que estimulam a ampliação clonal de linfócitos e previnem sua apoptose. Também liberam substâncias antimicrobianas que agem sobre uma vasta gama de bactérias patogênicas, as quais tornam o ambiente desfavorável ao seu desenvolvimento e crescimento, diminuindo a sua proliferação. Atuam prevenindo a adesão de microrganismos patógenos, devido sua competição por sítios receptores. Colabora para a promoção da tolerância oral, mecanismo pelo qual nosso organismo passa a não reagir a determinados antígenos. Contribuem para a manutenção da barreira mucosa intestinal, assim como na produção de anticorpos, na atividade de fagócitos e na dos linfócitos. Também modulam os mecanismos de ação do fator nuclear kappa B. Restringem a produção intestinal de citocinas pró-inflamatórias e aceleram a produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias [4].

2.4- Microbiota intestinal

O intestino é um tubo cilíndrico que se estende do piloro até o ânus (Figura 1). Possui várias funções básicas, entre elas a digestão, absorção e excreção de alimentos. Pesquisas têm apontado outras funções intestinais: imunológica, sendo que 70% das células imunológicas estão no intestino; a função nervosa e motora, com o sistema nervoso entérico agindo controlando os processos hormonais, digestórios e imunológicos e se conectando diretamente com o sistema nervoso central, sendo assim os neurônios cerebrais se dialogam constantemente com as células intestinais [6].

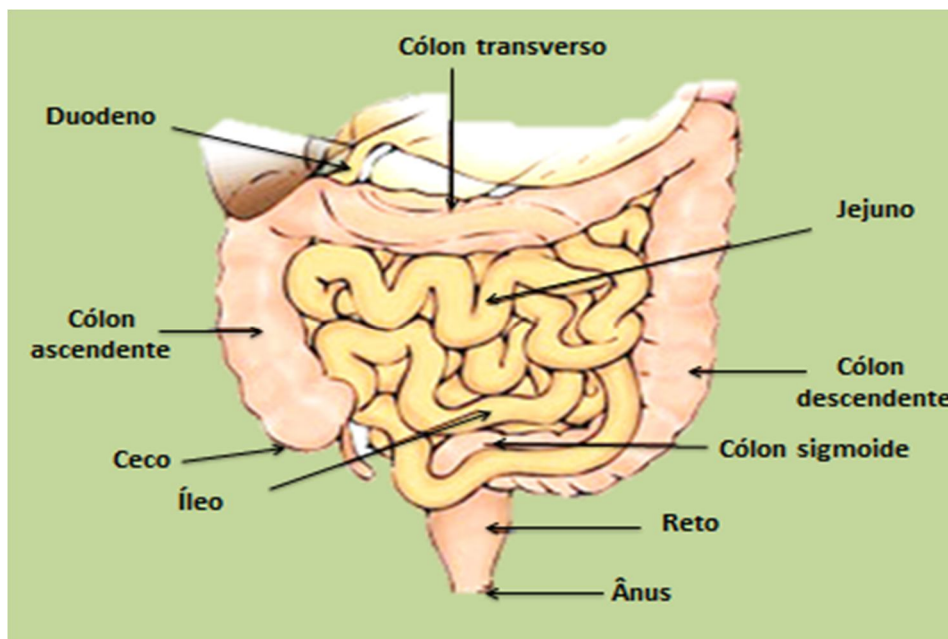


Figura 1: O intestino humano.
Fonte: Google Imagens, adaptada pelo autor.

Segundo Brandt, Sampaio e Miuki [27], no intestino humano existem aproximadamente 100 trilhões de bactérias, que são encontradas nos intestinos delgado e grosso, principalmente no cólon. Essas células bacterianas representam dez vezes o número de células do organismo humano como um todo. Esta enorme biomassa é formada por mais de 400 espécies bacterianas de importância vital para a nossa saúde, responsável por uma intensa atividade metabólica, de tão grande proporção, que alguns autores referenciam esta atividade como sendo maior do que a atividade hepática.

O conhecimento científico sobre a importância da microbiota intestinal para a saúde humana desperta interesses há muito tempo, um dos primeiros estudos foi realizado por um famoso cientista Louis, o qual afirmou que “os microrganismos são necessários para uma vida humana normal”. Nesse mesmo estudo, Louis demonstrou a existência do antagonismo bacteriano, ou seja, da competição pela sobrevivência entre duas espécies microbianas vivendo em um mesmo ambiente e da ocorrência de estratégias de ataque de uma sobre a outra [28].

Na parte estomacal, há uma menor quantidade e pouca variedade espécies bacterianas, sendo mais encontrado o gênero *Lactobacillus*, pois a colonização bacteriana nesta região é controlada pelo ácido clorídrico. Quando ocorre um esvaziamento gástrico muito rápido, torna-se prejudicial a adesão

destes microrganismos no estômago, levando a chegada de algumas ao duodeno, ao descerem pelo trato gastrointestinal (TGI) em direção ao íleo, não somente o número de microrganismos se torna mais evidente, mas os tipos de culturas predominantes também, principalmente próximo a válvula ileocecal. O intestino grosso é a região que aloja a maior quantidade bacteriana: 10^{10} a $10^{12}g^{-1}$ de tecido, com 13 espécies diferentes. Por concentrar o maior tempo de trânsito intestinal do trato gástrico intestinal, entre outros motivos, o intestino grosso permite uma maior adesão a colonização bacteriana [27].

No cólon existe um ambiente propício para a proliferação e colonização bacteriana, pois há ausência de secreções intestinais, peristaltismo lento e é rico em nutrientes. Do total de bactérias intestinais, 30% pertencem ao filo *Bacteroidetes*. Este filo é composto por cerca de 20 gêneros, gram-negativas, anaeróbicas e não formadoras de esporos, contendo enzimas que metabolizam carboidratos complexos e que modulam o sistema imune intestinal. Outro filo de bactérias de maior proporção no intestino são os *Firmicutes*, que contém mais de 250 gêneros, entre os principais: *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Mollicutes*, *Clostridium*. São bactérias gram-positivas, anaeróbicas e formadoras de esporos, responsáveis por fermentar açúcares simples. Os gêneros *Clostridium* e *Lactobacillus* desempenham função imunomoduladora benéfica e o gênero *Mollicute* induz a inflamação e ao desenvolvimento de certas doenças crônicas [6].

Estes dois filamentos representam 90% das bactérias que constituem o intestino humano e são importantes na homeostase energética do organismo, afetando o sistema imune e a resposta inflamatória, sendo que, nos indivíduos obesos, os *Bacteroidetes* têm uma proporção menor que nos indivíduos eutróficos, enquanto os *Firmicutes* predominam nas pessoas obesas [29].

Diariamente, a situação apresentada se encontra em modificação, pois essas bactérias também são eliminadas nas fezes, tornando esse panorama bastante dinâmico. A partir daí, pode-se chegar a um conceito fundamental: a colonização do trato gastrointestinal é temporária e não permanente, o que faz necessário estar sempre vigilantes em busca de um equilíbrio da microbiota intestinal [29].

A microbiota intestinal desempenha uma relevante função na saúde do sistema digestivo e também na saúde do organismo humano como um todo, contribuindo para a nutrição e o metabolismo do hospedeiro [27].

De acordo com Bagarolli [6], as principais funções são a modulação do pH intestinal, síntese de vitaminas, metabolização de carboidratos não digeríveis, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metabolização de ácidos biliares, prevenção de colonização por bactérias patogênicas, desenvolvimento do sistema imunológico intestinal, manutenção da função epitelial de barreira e motilidade do trato gastrointestinal (TGI).

Vários nutrientes são formados a partir da ação das bactérias e disponíveis para a absorção, entre as principais, as vitaminas do Complexo B, vitamina B12, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico e a vitamina K [30].

Conforme Bedani e Rossi [31], a microbiota realiza o aproveitamento de energia por meio da degradação de alimentos provindos da dieta, fermentando os carboidratos não digeríveis (fibras) e os transformando em ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato, acetato e lactato). Os mesmos diminuem o pH intestinal, reduzindo assim o número de bactérias patogênicas e elevando as bactérias benéficas e ainda produzem uma barreira contra fatores nocivos a mucosa intestinal.

As bactérias residentes do trato gastrointestinal contribuem para salvar parte de energia contida nos carboidratos indigeríveis da dieta como a celulose, hemicelulose e pectina, metabolizando os mesmos em ácidos graxos que são fontes de energia para as células do epitélio intestinal e facilitam a absorção de sódio e água, além de sintetizarem proteínas e vitaminas do Complexo B [19].

Pistelli e Costa [29], afirmam que, para manter suas funções e o equilíbrio, a microbiota normal está sujeita a um rígido controle, o que depende de vários fatores, como da acidez gástrica e da idade.

Alterações na composição da microbiota intestinal dependem de fatores ambientais e do estilo de vida, como uso de medicamentos, doenças, estresse e fadiga, o uso de antibióticos, envelhecimento, infecções de repetição, dieta, toxinas ambientais e álcool. Segundo Bagarolli [6], é necessário haver uma harmonia entre as bactérias intestinais para prevenir a disbiose. O aumento de microrganismos patogênicos e redução da microbiota saudável, que acarreta o aumento da permeabilidade intestinal e um processo inflamatório.

Tudo isso torna o indivíduo mais suscetível a desenvolver doenças associadas: infecções do trato geniturinário, síndrome fúngica, doença inflamatória intestinal, estresse, depressão, esteatose hepática não alcoólica, câncer colorretal, alergias, atopias, alterações dermatológicas, doenças autoimunes e doenças metabólicas (resistência à insulina, obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares). A flora intestinal desempenha uma papel fundamental, sendo considerado um órgão vital, que transporta metabólitos essenciais e que desempenha funções protetivas, estruturais e histológicas, auxiliando na manutenção da homeostase corporal [18].

2.5- Disbiose intestinal

A microbiota desempenha várias funções benéficas para o organismo, porém há um estoque de bactérias potencialmente patogênicas, que em junção a diversos fatores podem desencadear inúmeras patologias. Entre as principais funções da microbiota intestinal no organismo humano estão a produção de AGCC e proteína, que são absorvidos e utilizados pelo organismo. “A microbiota intestinal saudável é uma barreira de proteção contra invasores patogênicos, melhorando a imunidade e estimulando as respostas imunes” [30].

Segundo Machado [19], existe uma forte relação entre o intestino e a saúde, em que a absorção de nutrientes pode ser alterada devido a várias causas como: interação entre nutrientes, ingestão de medicamentos (antibióticos), mudanças na alimentação (dieta desequilibrada), alteração da permeabilidade da mucosa intestinal, o que pode evoluir para uma disbiose intestinal.

A alimentação adequada dá suporte à integridade intestinal, que se relaciona à função única do intestino de atuar como um canal entre os nutrientes e a circulação sistêmica e como barreira contra toxinas de uma variedade de fontes [30].

O desequilíbrio da microbiota intestinal é chamado de disbiose, o que leva à perda da homeostasia entre hospedeiro e microrganismos, ocorrendo o predomínio das bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas. Essa desregulação da microbiota produz efeitos prejudiciais, como: destruição de vitaminas, inativação de enzimas, produção de toxinas cancerígenas (toxinas se combinam com proteínas formando peptídeos perigosos) e destruição da

mucosa intestinal, submetendo o organismo a uma menor absorção e síntese de nutrientes [19].

Uma das principais causas de desequilíbrio da microbiota intestinal é o estilo de vida ocidental, principalmente a ingestão de dietas ricas em calorias, gorduras saturadas, carboidratos simples e pobre em fibras [29].

Um fator considerável no desequilíbrio da microbiota intestinal é a obesidade, que interfere na população de dois filos principais de bactérias presentes no intestino delgado e grosso, as *Firmicutes* e os *Bacteroidetes*. Sendo a microbiota intestinal um importante regulador de peso corporal e de doenças associadas à obesidade, pois o metabolismo destas bactérias facilita a extração ou estocagem de calorias ingeridas na dieta [32].

O alimento é um substrato para o crescimento da microbiota intestinal e afeta diretamente sua composição. E dependendo dos nutrientes oferecidos, podem aumentar ou diminuir os micro-organismos benéficos. O aumento do consumo de açúcares refinados, gorduras saturadas e sódio, em detrimento de fibras, vitaminas, minerais e compostos antioxidantes leva a alterações significativas no ecossistema intestinal ao longo dos anos, podendo resultar no aumento de doenças crônicas, tais como obesidade [21].

Para minimizar os efeitos do desequilíbrio da microbiota e garantir um bom funcionamento, recomenda-se o uso de substâncias funcionais como os probióticos, pois possuem bactérias benéficas para o organismo diminuindo a concentração de bactérias patogênicas [19].

Os alimentos são vistos como o principal meio para a saúde e o bem-estar, principalmente os alimentos conhecidos como funcionais. “Qualquer alimento ou ingrediente alimentar que possa exercer efeito benéfico no organismo pode ser considerado alimento funcional” [33].

Uma alimentação equilibrada, com todos os macronutrientes e micronutrientes em quantidades adequadas para o indivíduo, resultam em um bom funcionamento do organismo, promovendo a prevenção, a manutenção e o tratamento de diversas patologias.

2.6- Efeitos benéficos dos probióticos

Atualmente vários estudos clínicos vêm sendo realizados com o objetivo de verificar possíveis aplicações de bebidas lácteas probióticas na redução da infecção por *Helicobacter pylori*, na redução dos sintomas alérgicos, no alívio da

constipação intestinal, na diminuição dos sintomas da síndrome do cólon irritável, na melhora do metabolismo mineral (particularmente na absorção do cálcio, o que dá estabilidade e melhora a densidade óssea), na prevenção do câncer colorretal, na diminuição da concentração de colesterol totais e de triglicerídeos plasmáticos, na prevenção e/ou tratamento diversos tipos de diarreia, no benefício na melhora da artrite reumatoide, na prevenção e tratamento do eczema atópico, rinite e asma e no tratamento da colite ulcerativa e no tratamento da obesidade [20].

2.6.1- Diarreia

Cada vez mais vem surgindo novos estudos sobre os efeitos do uso de probióticos na redução dos episódios de diarreia. Os *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarium* e *E. faecium* demonstram-se eficiência na prevenção e no tratamento de diversas diarreias associadas à contaminação de alimentos por *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *B. cereus* e *V. cholerae*, na diarreia viajante e na antibioticoterapia. Os efeitos benéficos se dá pela produção de substâncias antimicrobianas como acidolina, acidofilina e bacteriocina, lactobrevina, lactobacilina, lactolina e bulgaricina, que atuam inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, também são responsáveis pela produção de substâncias como ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico e peróxido de hidrogênio, que melhora a integridade da mucosa intestinal. Diversas bactérias probióticas estão associados com a prevenção e o tratamento da diarreia associada ao uso de antibióticos; ainda reduzem o tempo de diarreia durante enterites provocadas por rotavírus em crianças, sobretudo quando administradas precocemente e em doses acima de 10^8 UFC/ml. Os *Lactobacillus rhamnosus* GG são os probióticos mais efetivos na prevenção e no tratamento das diarreias [5].

Um estudo realizado por Wenus et al. [34], em um hospital universitário do Norte da Noruega, com 87 pacientes com quadro de diarreia, os quais, foram submetidos ao tratamento com ingestão diária de leite fermentado contendo probióticos ou placebo com bactérias mortas pelo calor, durante um período de 14 dias. Concluiu-se que o grupo que recebeu a bebida láctea probiótica teve uma redução significativa no quadro de diarreia, indicando que o leite fermentado

com probióticos, pode diminuir o quadro de diarreia em pacientes adultos hospitalizados.

2.6.2- Intolerância à lactose

De acordo com Paschoal et al. [20], mais de 70% da população mundial é atingida pela intolerância à lactose, a qual ocorre quando a quantidade de lactose ingerida é superior à capacidade tolerada pelo intestino delgado, o qual não consegue hidrolisar totalmente, deixando-as chegarem até o cólon, onde será fermentada, gerando ácidos orgânicos, dióxido de carbono e hidrogênio, causadores de diarreias típicas em casos de intolerância. As bactérias probióticas, como os *Lactobacillus acidophilus*, auxiliam na hidrólise da lactose, diminuindo os sintomas.

2.6.3- Sistema imunológico

Inúmeros estudos comprovam que uma microbiota intestinal saudável auxilia no desenvolvimento adequado do sistema imune, além disso, mantém fisiologicamente normal o tecido linfóide associado à mucosa na vida adulta. Lammers et al. [35], durante seus estudos notou que as bactérias probióticas aumentam os linfócitos circulantes, a produção de IFN- γ , IL-1, IL-8 e citocinas que instigam a fagocitose.

Ainda há estudos que indicam, que o tratamento com microrganismos probióticos são extremamente benéficos ao sistema imune dos praticantes de atividade física. Wang et al. [4], verificaram que os atletas que realizavam atividade física anaeróbica e receberam como forma de tratamento *Lactobacillus casei* apresentaram maior concentração de células de defesas se comparado com outro grupo que não havia recebido a suplementação de bactérias probióticas.

2.6.4- Síndrome do intestino irritável

A Síndrome do intestino irritável é considerada uma desordem gastrointestinal funcional de maior prevalência no mundo. Os portadores desta síndrome apresentam uma microbiota intestinal bastante instável e em constante modificação, o que leva a uma disbiose intestinal e ao aumento da fermentação, o que pode causar inflamação na parede intestinal, o uso de bactérias probióticas vem sendo utilizadas como forma de tratamento, melhorando o sistema imunológico e o trânsito colônico [20].

Em um estudo realizado por O'Sullivan e O'Morain [36], com 24 pacientes com a Síndrome do intestino irritável, dos quais, alguns receberam o probiótico e outros placebo. Notou-se que o grupo que recebeu as bactérias probióticas apresentou melhora no sintoma de diarreia, indicando que a cepa pode trazer benefícios ao paciente portador desta síndrome.

Outro estudo realizado com bactérias probióticas (*Lactobacillus plantarum* 299V), tiveram resultados variáveis. Alguns obtiveram melhora da distensão abdominal, melhora na sintomatologia geral em 95% dos pacientes analisados e uma tendência à normalização no número evacuação dos pacientes constipados. No entanto, outros colaboradores obtiveram diminuição na produção de hidrogênio no cólon, mas esta não foi significativa para ter eficácia [37].

Bazzocchi et al. [38], conduziram um outro estudo, que utilizou um suplemento probiótico contendo oito culturas, chamado VSL (lactobacilos, bifidobactérias e estreptococos). Os pacientes portadores Síndrome do intestino irritável apresentaram uma melhora de 81% dos sintomas e uma redução significativa no número de evacuações.

2.6.5- Constipação intestinal

Segundo Saad [39], indivíduos com constipação intestinal podem ter alterações na composição de microbiota do intestino grosso, que é caracterizada por uma diminuição no número de bactérias intestinal benéficas e um grande aumento na quantidade de microrganismos potencialmente patogênicos e fungos. Esta desordem pode alterar o ambiente metabólico no intestino, causando mudanças

na concentração de substâncias fisiologicamente ativas que podem modificar as funções secretórias e a motilidade intestinal. Estes sintomas podem ser minimizados com a administração de probióticos, com objetivo de normalizar a flora intestinal e estimular a atividade motora do intestino.

Nóbrega [2], relata que para assegurar o efeito contínuo, os probióticos devem ser consumidos diariamente. Para garantir um efeito benéfico na composição da microbiota intestinal recomenda doses de 100g de produtos alimentícios, contendo 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de microrganismos probióticos, ou suplemento probiótico contendo pelo menos 10^9 UFC.

2.6.6- Obesidade

A obesidade é considerada um dos mais graves problemas de saúde pública atual, pois eleva os riscos de várias enfermidades associadas, como hipertensão arterial, dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, doenças da vesícula biliar, alguns tipos de câncer, esteatose hepática, osteoartrite, apneia do sono e outras [17].

Recentemente foram demonstrados indícios de que o aumento de peso está relacionado ao desequilíbrio da microbiota intestinal, a chamada disbiose, ou seja, quando há um aumento de microrganismos patogênicos e redução da microbiota saudável, o que leva ao desenvolvimento da permeabilidade intestinal, a um processo inflamatório, e consequentemente à obesidade [40]

Mudanças dinâmicas na microbiota, bem como comportamentos e predisposições genéticas, trabalham em conjunto para determinar a resposta de cada indivíduo ao aumento do acúmulo de tecido adiposo. O metagenoma intestinal, que consiste na análise da sequência de DNA microbiano, deve ser considerado como fator de risco juntamente com fatores clássicos como, por exemplo, a genética do hospedeiro e fatores ambientais para o desenvolvimento de doenças metabólicas [22].

Spezia et al. [41], apontam que o tratamento da obesidade é dividido em cinco intervenções: prática de atividade física frequente, acompanhamento psicológico, uso de fármacos, intervenção cirúrgica e tratamento nutricional.

Para a melhor eficácia do tratamento nutricional convencional (dieta hipocalórica), que apenas controla o balanço energético, deve se associar a

modulação da qualidade e a quantidade dos microrganismos intestinais por meio da utilização de substâncias benéficas, como probióticos [18].

A ingestão regular de probióticos promove vários benefícios para a saúde do hospedeiro, como: tornar o meio intestinal desfavorável ao crescimento de microrganismos patogênicos e ajudar na destruição dos mesmos; reduzir a concentração sanguínea de lipídios; agir como imunomoduladores; reduzir a gordura corporal (visceral e subcutânea), IMC, à sensibilidade à insulina e à inflamação. “Estes microrganismos, devem necessariamente, sobreviver às condições ácidas do estômago e da bile, ser capaz de aderir à mucosa intestinal e de colonizar o intestino, mesmo que transitoriamente” [21].

Várias espécies de *Lactobacilos* foram testadas como uma abordagem probiótica em modelos experimentais de obesidade e em seres humanos. Cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* e *Lacto-bacillus paraceseispp* reduziram o tamanho dos adipócitos e células de gordura corporal em ratos alimentados com dieta rica em gordura [22].

Brancher [18], aponta que os probióticos que apresentam efeitos mais consistentes no tratamento da obesidade são os gêneros *Lactobacillus gasseri* utilizado em leite fermentado (200 g/dia) e o *Lactobacillus rhamnosus* administrado na forma de cápsulas em dosagem de duas vezes/dia. Pois estes reduzem a gordura corporal total, gordura visceral e subcutânea abdominal, circunferência da cintura e do quadril, razão cintura-quadril, percentual de gordura e massa gorda. Porém, o consumo deve ser frequente e em longo prazo.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Leites fermentados

Foram utilizados leites fermentados adquiridos em supermercados da região do noroeste paulista. Foram selecionadas doze marcas cujas embalagens eram de plástico contendo seis unidades de 80g, apresentando informações, tais como data de fabricação, data de vencimento, lote, presença de *Lactobacillus* vivos, composição nutricional, temperatura de armazenamento (entre 1 a 10° C) e número de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [24].

As amostras de leite fermentado foram selecionadas pela data de fabricação e pelo lote mais próximo a data de fabricação, sendo que estes deviam ser as mesmas para marca a ser avaliada. Na amostragem foi considerado o tempo transcorrido entre data de fabricação e a aquisição do produto, o qual não poderia ser superior a sete dias.

Para o transporte das amostras foram empregadas caixas isotérmicas contendo gelo, sendo que a temperatura interna aferida foi de 2° C. Durante toda a fase experimental os leites fermentados foram mantidos em temperaturas de 5° C e 15° C, por um período de oito semanas, das quais cinco semanas corresponderam ao prazo de validade e três fora do prazo de validade. Os leites fermentados foram avaliados, semanalmente, quanto ao pH e à determinação de células viáveis das bactérias ácido lácticas (BAL).

3.2- Análise da viabilidade de bactérias ácido lácticas

Os procedimentos que precederam a análise microbiológica foram realizados em condições assépticas. As embalagens foram sanitizadas com álcool etílico 70% e transferidas para capela de fluxo laminar vertical, o qual foi descontaminado previamente.

As análises microbiológicas realizadas seguiram os protocolos propostos por American Public Health Association [42] e Silva [43]. Para a contagem total de bactérias ácido lácticas viáveis, 25g de cada amostra foram homogeneizadas em 225mL de diluente estéril (água peptonada, 0,1%), obtendo-se a diluição 10⁻¹. A partir da diluição inicial (10⁻¹) foram realizadas diluições decimais seriadas

até 10^{-9} . Alíquotas de 1mL das diluições selecionadas foram inoculadas em placas de Petri estéreis vazias e, em seguida, o meio de Man Rogosa & Sharpe (MRS) acidificado, foi adicionado pela técnica de *Pour Plate*, Pereira et al. [44], e o material foi homogeneizado.

Os controles, positivo e negativo das culturas foram obtidos com a semeadura de uma alíquota do leite fermentado sem diluição e de ágar MRS sem leite fermentado, respectivamente. Todo o experimento foi realizado em triplicata. A temperatura de incubação foi $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, sob condições de anaerobiose em jarra de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose (OXOID, PROBAC). Em seguida, e nesse período, a enumeração dos microrganismos foi feita por meio da contagem do número de colônias formadas nas placas, sendo este número multiplicado por 10 e também pelo inverso da diluição, os valores obtidos foram expressos como UFC mL^{-1} (unidades formadoras de colônias)

3.3- Determinação do pH de leites fermentados

A mensuração do pH inicial e durante a fase experimental foi realizada em triplicata, e nas temperaturas de 5°C e 10°C . Cada embalagem foi agitada manualmente por 15 segundos, coletando-se três amostras de 15 mL de cada marca. Foi utilizado um potenciômetro e eletrodo de vidro combinado (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), previamente calibrado com soluções padrão pH 7,0 e pH 4,0, antes de cada leitura. A leitura das amostras foi realizada introduzindo o eletrodo de vidro diretamente nas amostras.

3.4- Análise estatística

Os dados foram avaliados pela análise descritiva da viabilidade das bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de diversos leites fermentados, de acordo com o período de validade (durante e após) e com a temperatura (5°C e 15°C).

Posteriormente foi aplicado o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$) para comparação da viabilidade das BAL em relação ao período de validade e temperatura empregadas no estudo.

Foi aplicada também o teste de Análise de Variância com teste de comparação múltipla de Games-Howell ($P < 0,05$), para a comparação da viabilidade das BAL entre as marcas considerando somente o período durante a validade.

O Teste de t foi utilizado para amostras independentes e teste t para amostras emparelhadas ($P < 0,05$), para comparar o pH de acordo com a temperatura e com o período de validade, respectivamente.

A aplicação do teste de Análise de Variância com teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$), para a comparação do pH entre as marcas considerando somente o período durante a validade.

Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). O Software utilizado foi Minitab 17 (Minitab Inc.).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo consistiu na quantificação das bactérias ácido lácticas viáveis em leites fermentados em dois períodos: um período referente ao prazo de validade, referente a cinco semanas, e o período fora do prazo de validade, referente a três semanas. Além dos períodos de análise, a quantificação da viabilidade das bactérias ácido lácticas, foi avaliada em duas diferentes temperaturas: 5 °C e 15 °C. Adicionalmente à quantificação das bactérias lácteas, o pH do leite fermentado nesses tratamentos mencionados também foi analisado como forma de observar a presença de diferenças significativas na comparação dos prazos de validade e nas temperaturas empregadas.

Em um primeiro momento foi realizado um estudo da quantificação das bactérias lácteas em dois períodos: no prazo de validade e após o prazo de validade, assim como em duas temperaturas, 5 °C e 15 °C, perfazendo quatro tratamentos para cada marca. Vale ressaltar que foram avaliadas doze marcas de leite fermentado.

Segundo Gon [1], para que o leite fermentado alcance sua funcionalidade probiótica é necessário que atenda uma série de requisitos, sendo o principal a viabilidade das bactérias lácteas. Para que isso aconteça os microrganismos probióticos devem apresentar quantidades mínimas exigidas pela legislação brasileira, de acordo com Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, nº 46, de 23 de outubro de 2007, até o momento do consumo do produto, sendo que a contagem total de bactérias ácido lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/mL⁻¹ no produto final, durante o prazo de validade [24].

A Tabela 5 apresenta os resultados da quantificação das bactérias ácido lácticas de cada uma das marcas avaliadas (M1 a M12), em relação aos períodos de validade dos leites fermentados e às temperaturas. Em um primeiro momento, os testes comparativos apresentaram como objetivo comparar as diferenças na quantificação das bactérias lácticas (BAL) entre os períodos de validade, restringindo a temperatura e, em um segundo momento, a comparação se deu entre as temperaturas, considerando o mesmo prazo de validade.

Tabela 5: Estatísticas descritivas da viabilidade das BAL de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada.

Marca	Temperatura	Prazo de validade				Valor P ¹
		Durante		Após		
		Média±DP	Md	Média±DP	Md	
M1	5 °C	6,3.10 ⁹ ±4,8.10 ⁹	9,0.10 ⁹	1,4.10 ⁷ ±2,5.10 ⁷	5,0.10 ⁶	<0,001
	15 °C	2,8.10 ⁹ ±4,9.10 ⁹	1,2.10 ⁸	3,5.10 ¹ ±5,1.10 ¹	1,0	<0,001
	Valor P	0,038		<0,001		
M2	5 °C	6,7.10 ⁸ ±2,3.10 ⁸	6,2.10 ⁸	4,1.10 ⁶ ±5,1.10 ⁶	1,5.10 ⁶	<0,001
	15 °C	7,3.10 ⁸ ±1,0.10 ⁹	1,0.10 ⁷	4,9±6,9	1,0	<0,001
	Valor P	0,360		<0,001		
M3	5 °C	2,1.10 ⁸ ±3,1.10 ⁸	1,0.10 ⁸	7,5.10 ⁴ ±4,9.10 ⁴	1,0.10 ⁵	<0,001
	15 °C	1,8.10 ⁸ ±3,2.10 ⁸	1,9.10 ⁶	2,0.10 ² ±3,0.10 ²	0,0	<0,001
	Valor P	0,064		<0,001		
M4	5 °C	1,2.10 ⁹ ±2,1.10 ⁹	4,0.10 ⁷	1,9.10 ⁵ ±2,3.10 ⁵	7,0.10 ⁴	<0,001
	15 °C	6,9.10 ⁸ ±1,3.10 ⁹	4,3.10 ⁷	1,7.10 ¹ ±2,5.10 ¹	0,0	<0,001
	Valor P	0,360		<0,001		

¹ Valor P referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05.

Tabela 5. Estatísticas descritivas da viabilidade das BAL de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada (continuação).

Marca	Temperatura	Prazo de validade				Valor P ¹
		Durante		Após		
		Média±DP	Md	Média±DP	Md	
M5	5 °C	1,3.10 ⁴ ±1,7.10 ⁴	3,3.10 ³	0,0±0,0	0,0	_ ²
	15 °C	9,3.10 ³ ±1,8.10 ⁴	1,0.10 ²	0,0±0,0	0,0	_ ²
	Valor P	0,060		_ ²		
M6	5 °C	1,3.10 ⁹ ±1,5.10 ⁹	2,1.10 ⁸	3,7.10 ⁵ ±3,7.10 ⁵	1,5.10 ⁵	<0,001
	15 °C	7,6.10 ⁸ ±1,3.10 ⁹	1,4.10 ⁸	1,0±1,5	0,0	<0,001
	Valor P	0,479		<0,001		
M7	5 °C	3,4.10 ⁶ ±2,5.10 ⁶	3,4.10 ⁶	5,5.10 ⁴ ±6,5.10 ⁴	3,0.10 ⁴	<0,001
	15 °C	1,5.10 ⁶ ±3,1.10 ⁶	4,3.10 ³	0,0±0,0	0,0	_ ²
	Valor P	0,004		_ ²		
M8	5 °C	2,0.10 ⁶ ±3,3.10 ⁶	8,8.10 ⁵	1,2.10 ⁴ ±1,7.10 ⁴	2,7.10 ³	<0,001
	15 °C	1,7.10 ⁶ ±3,5.10 ⁶	2,4.10 ³	0,0±0,0	0,0	_ ²
	Valor P	0,010		_ ²		

¹ Valor P referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05. ² Valor P não possível de ser computado devido à ausência de variabilidade dos dados de um ou mais tratamentos (desvio padrão nulo).

Tabela 5. Estatísticas descritivas da viabilidade das BAL de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada (continuação).

Marca	Temperatura	Prazo de validade				Valor P ¹
		Durante		Após		
		Média±DP	Md	Média±DP	Md	
M9	5 °C	4,8.10 ⁶ ±3,7.10 ⁶	3,3.10 ⁶	8,6.10 ⁴ ±1,2.10 ⁵	7,0.10 ³	<0,001
	15 °C	2,0.10 ⁶ ±4,1.10 ⁶	5,6.10 ³	0,0±0,0	0,0	_ ²
	Valor P	0,003		_ ²		
M10	5 °C	9,4.10 ⁸ ±1,3.10 ⁹	3,4.10 ⁸	2,9.10 ⁶ ±4,1.10 ⁶	2,7.10 ⁵	<0,001
	15 °C	7,8.10 ⁸ ±1,6.10 ⁹	3,9.10 ³	0,3±0,5	0,0	<0,001
	Valor P	0,005		<0,001		
M11	5 °C	6,5.10 ⁸ ±7,2.10 ⁸	2,9.10 ⁸	6,2.10 ⁶ ±9,3.10 ⁶	5,0.10 ³	<0,001
	15 °C	3,9.10 ⁸ ±8,1.10 ⁸	8,0.10 ³	0,3±0,5	0,0	<0,001
	Valor P	0,004		<0,001		
M12	5 °C	3,9.10 ⁶ ±3,2.10 ⁶	3,4.10 ⁶	1,0.10 ⁴ ±1,5.10 ⁴	5,0.10 ²	<0,001
	15 °C	1,7.10 ⁶ ±3,7.10 ⁶	6,0.10 ²	0,0±0,0	0,0	_ ²
	Valor P	0,005		_ ²		

¹ Valor P referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05. ² Valor P não possível de ser computado devido à ausência de variabilidade dos dados de um ou mais tratamentos (desvio padrão nulo).

Os resultados da Tabela 5 evidenciam que, em todos os casos referentes à comparação da viabilidade das BAL entre os períodos de validade (durante e após), quando possíveis de serem efetuados, comprovou-se a menor viabilidade das BAL no período após o prazo de validade, ou seja, os leites fermentados quando, encontram-se no período após o prazo de validade estabelecido no rótulo perdem quantidades significativas de bactérias ácido lácticas. Desse modo, é possível sugerir que, para todas as marcas, a viabilidade das BAL é significativamente menor após o prazo de validade quando comparada à viabilidade das BAL durante o prazo de validade. Nesse contexto, para que o leite fermentado proporcione suas funções probióticas, é necessário que seja consumido durante o período de validade.

Resultado semelhante foi observado no estudo de Varga, Süle e Nagyt [45], ao monitorar a viabilidade dos *Lactobacillus* durante o armazenamento por 42 dias, verificaram que durante o armazenamento houve uma diminuição significativa destes microrganismos, ficando patente que, para o melhor aproveitamento de suas funcionalidades probióticas, o produto deve ser consumido sempre dentro do prazo de validade.

Souza et al. [46], também ao investigar a viabilidade celular de *Bifidobacterium longum* 51A nos leites fermentados, verificaram durante o estudo, que até 14 dias de armazenamento as bactérias ácido lácticas encontravam-se em grandes quantidades. No entanto, após esse período de armazenamento a viabilidade celular diminuiu significativamente, atingindo valores inferiores a 3 unidades log, até o final do período de armazenamento refrigerado, comprovando que quanto maior o tempo de armazenamento, menor é número de microrganismos presente nos leites fermentados.

Em outro estudo dos autores Thu, Tuan e Van [47], ao avaliar a viabilidade dos probióticos selecionados no leite de soja, verificaram que a quantidade de microrganismos manteve-se estável durante as quatro primeiras semanas, aproximadamente 10^7 UFC/mL⁻¹ e. No decorrer do estudo a quantidade de bactérias foram diminuindo, e ao final da sexta semana de análise apresentava cerca de 10^5 UFC/mL¹, comprovando que ao longo do período de armazenamento há uma redução significativa no número de bactérias lácteas, o que reduz a qualidade dos produtos probióticos.

Também no estudo de Oliveira, et al. [48], ao avaliar viabilidade das bactérias probióticas em bebidas lácteas ao longo do armazenamento, verificou-se que no início das análises as contagens de microrganismos viáveis eram em torno 10^8 UFC/mL e durante quatorze dias de armazenagem as contagens permaneceram estáveis, mas após vinte um dias de armazenagem pode-se observar que a concentração de bactérias foi afetada, ocorrendo uma diminuição significativa e que após 28 dias as contagens de bactérias probióticas reduziram 1,74 unidades log.

Em estudo realizado por Hungria e Longo [49], foi verificada grande redução do número de bactérias ácido lácticas viáveis, conforme evoluiu o tempo da vida-de-prateleira e 10 dias após o prazo de validade, apesar das características organolépticas dos produtos encontrarem-se inalteradas, o número de microrganismos sobreviventes não atingia o mínimo exigido pela atual legislação, indicando que o consumo de tais alimentos, após o vencimento, não confere os benefícios probióticos esperados. Na presente pesquisa observaram-se resultados semelhantes de redução de microrganismos no período de validade assim como fora do mesmo (tabela 5)

Restringindo a comparação das temperaturas em relação ao período durante o prazo de validade, foi possível observar diferenças significativas na viabilidade das BAL em 7 marcas: M1, M7, M8, M9, M10, M11 e M12; sendo que, em todas elas foi possível observar menor viabilidade das BAL em temperaturas superiores, ou seja, de 15 °C. Sendo assim, é interessante que os leites fermentados sejam mantidos à temperatura de refrigeração para que a viabilidade das BAL não seja prejudicada. Para as marcas M2, M3, M4, M5 e M6, a temperatura não foi fator significativo para determinar menor viabilidade das BAL, ou seja, não houve diferenças significativas entre a contagem das BAL quando as temperaturas de 5 °C e 15 °C foram comparadas.

Resultado semelhante foi possível de ser observado na comparação da viabilidade das BAL em diferentes temperaturas em relação ao período após à validade. A viabilidade das BAL foi significativamente inferior na temperatura de 15 °C quando comparada à viabilidade das BAL à 5 °C. Sendo assim, tanto durante como após o prazo de validade, a viabilidade das BAL foi significativamente inferior na temperatura de 15 °C. Resultados semelhantes foram observados por Varga, Süle e Nagyt [45], ao monitorar a viabilidade dos

Lactobacillus durante 42 dias, observaram que quando os produtos eram armazenados em temperatura a 4 ° C, relativamente baixa, a diminuição das bactérias ácido lácticas era mais lenta, comprovando que se os alimentos probióticos forem armazenados em uma temperatura menor, melhor será sua viabilidade.

Nesse contexto, de uma forma geral, na Tabela 5 evidencia-se que a viabilidade das BAL diminuiu com o aumento do prazo de validade e com o aumento da temperatura. Sendo assim, é necessário que o consumidor ingira o leite fermentado refrigerado e no prazo de validade para que usufrua dos benefícios dos probióticos ali existentes.

As figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 evidenciam os valores individuais da contagem das BAL, sendo as medianas delimitadas pelos pontos em vermelho.

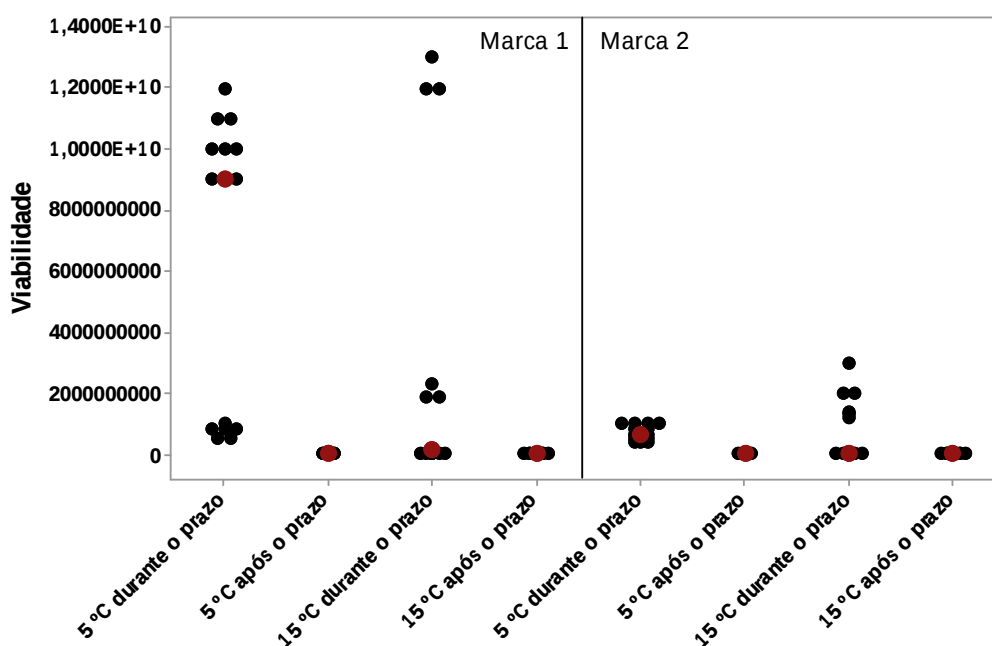


Figura 2: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 1 e 2 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

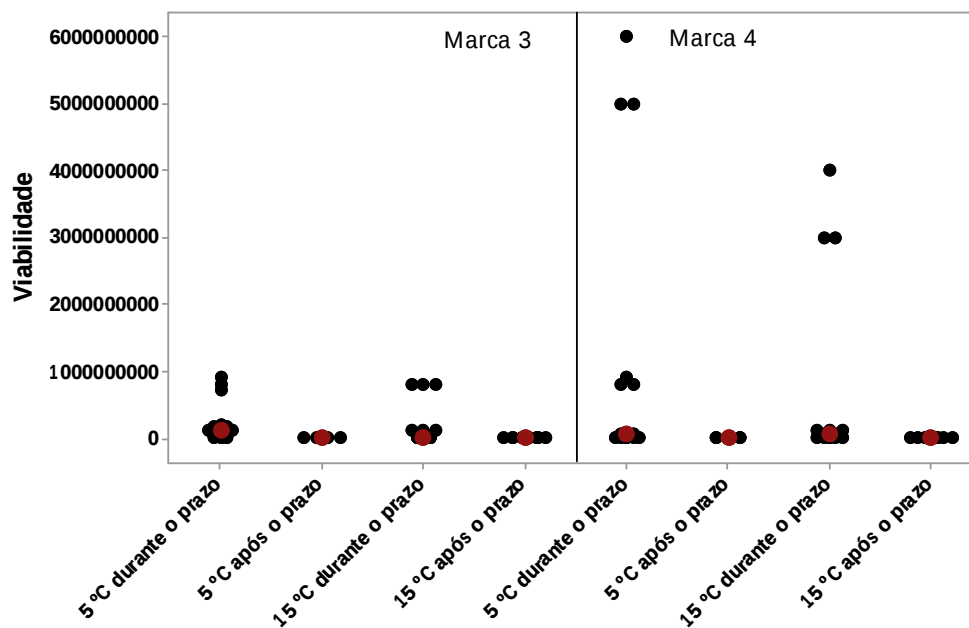


Figura 3: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 3 e 4 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

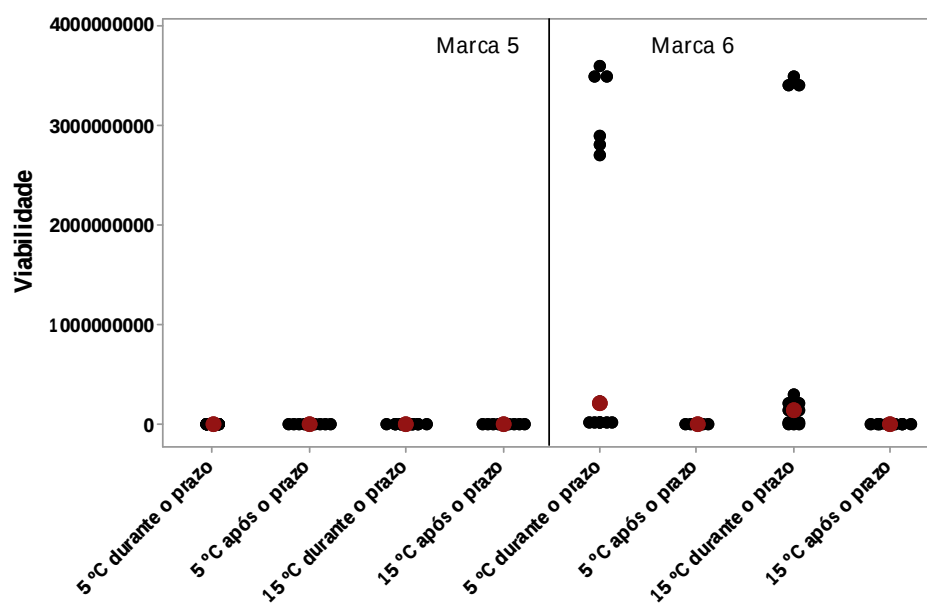


Figura 4: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 5 e 6 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

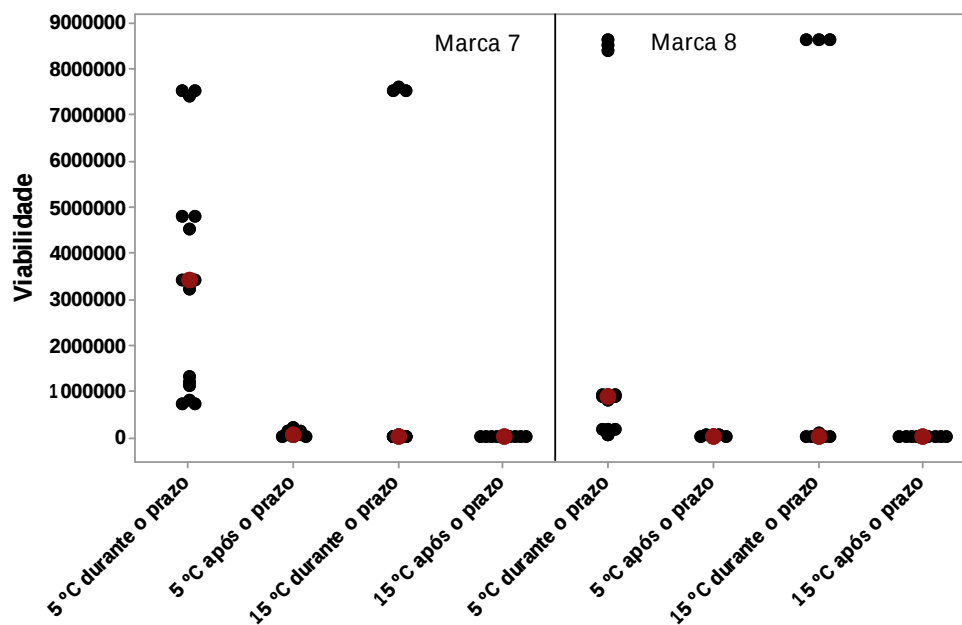


Figura 5: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 7 e 8 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

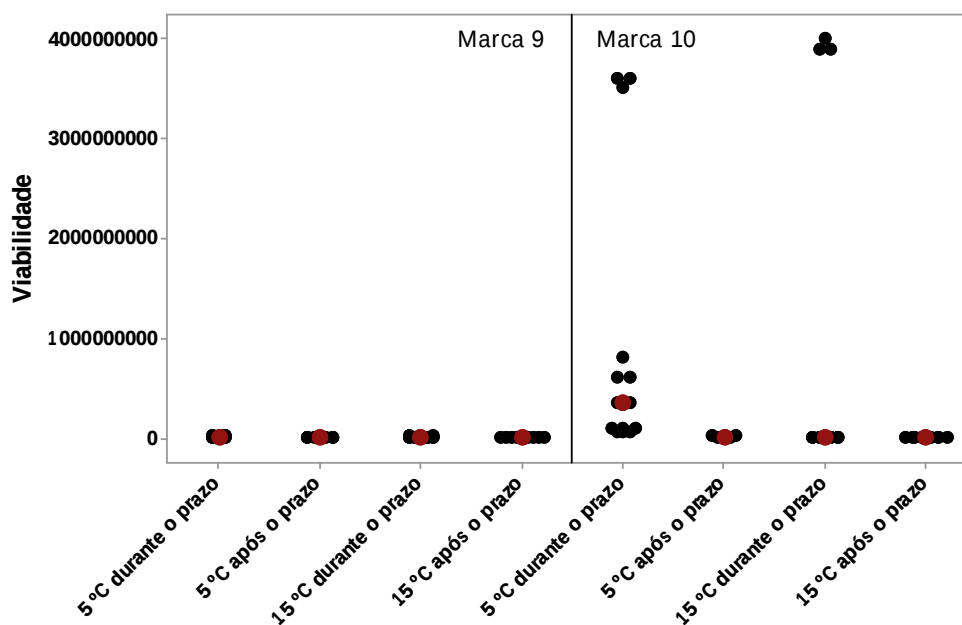


Figura 6: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 9 e 10 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

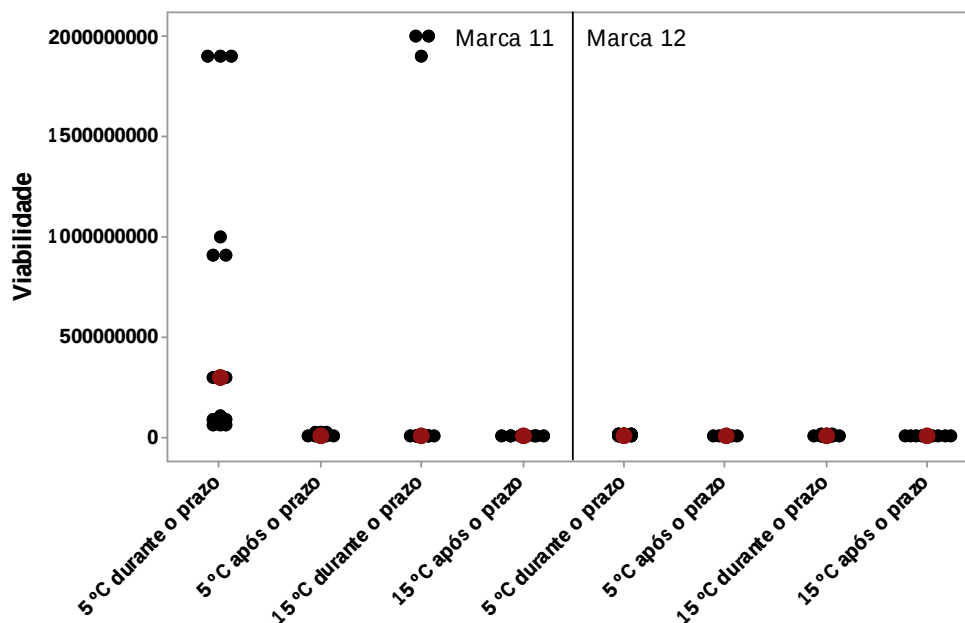


Figura 7: Distribuição da viabilidade das BAL nas marcas 11 e 12 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

A Tabela 6 apresenta os resultados da viabilidade das BAL considerando somente o que foi quantificado durante o prazo de validade a fim de comparar as marcas de acordo com as duas temperaturas abordadas.

Os resultados da Tabela 6 sugerem que a marca 1 (M1) apresentou a maior viabilidade de BAL dentre as marcas avaliadas, pois a contagem microbiana foi superior às demais marcas nas temperaturas de 5 °C e 15 °C. Nesse contexto, a marca M1 se destacou frente às demais marcas, apresentando a maior viabilidade de BAL.

Tabela 6: Viabilidade das bactérias lácticas conservadas a 5°C e 15°C em relação às marcas avaliadas durante o prazo de validade.

Temperatura	Marcas	Viabilidade		Valor P
		Média±DP ²	Md	
5 °C	M1	6,3.10 ⁹ ±4,8.10 ⁹ a	9,0.10 ⁹	<0,001
	M2	6,7.10 ⁸ ±2,3.10 ⁸ b	6,2.10 ⁸	
	M3	2,1.10 ⁸ ±3,1.10 ⁸ b	1,0.10 ⁸	
	M4	1,2.10 ⁹ ±2,1.10 ⁹ b	4,0.10 ⁷	
	M5	1,3.10 ⁴ ±1,7.10 ⁴ b	3,3.10 ³	
	M6	1,3.10 ⁹ ±1,5.10 ⁹ b	2,1.10 ⁸	
	M7	3,4.10 ⁶ ±2,5.10 ⁶ b	3,4.10 ⁶	
	M8	2,0.10 ⁶ ±3,3.10 ⁶ b	8,8.10 ⁵	
	M9	4,8.10 ⁶ ±3,7.10 ⁶ b	3,3.10 ⁶	
	M10	9,4.10 ⁸ ±1,3.10 ⁹ b	3,4.10 ⁸	
	M11	6,5.10 ⁸ ±7,2.10 ⁸ b	2,9.10 ⁸	
	M12	3,9.10 ⁶ ±3,2.10 ⁶ b	3,4.10 ⁶	
15 °C	M1	2,8.10 ⁹ ±4,9.10 ⁹ a	1,2.10 ⁸	<0,001
	M2	7,3.10 ⁸ ±1,0.10 ⁹ b	1,0.10 ⁷	
	M3	1,8.10 ⁸ ±3,2.10 ⁸ b	1,9.10 ⁶	
	M4	6,9.10 ⁸ ±1,3.10 ⁹ b	4,3.10 ⁷	
	M5	9,3.10 ³ ±1,8.10 ⁴ b	1,0.10 ²	
	M6	7,6.10 ⁸ ±1,3.10 ⁹ b	1,4.10 ⁸	
	M7	1,5.10 ⁶ ±3,1.10 ⁶ b	4,3.10 ³	
	M8	1,7.10 ⁶ ±3,5.10 ⁶ b	2,4.10 ³	
	M9	2,0.10 ⁶ ±4,1.10 ⁶ b	5,6.10 ³	
	M10	7,8.10 ⁸ ±1,6.10 ⁹ b	3,9.10 ³	
	M11	3,9.10 ⁸ ±8,1.10 ⁸ b	8,0.10 ³	
	M12	1,7.10 ⁶ ±3,7.10 ⁶ b	6,0.10 ²	

¹ Valor P referente ao teste de Análise de Variância a P<0,05. ² Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Games-Howell a P<0,05.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados do pH de cada um dos leites fermentados referentes às marcas avaliadas (M1 a M12) em relação ao período de validade e às temperaturas de conservação. De acordo com Thamer e Penna [14], na produção de leites fermentados o pH final ideal é de aproximadamente 4,7. Sendo necessário atingir esse média em no máximo 24h para garantir a segurança microbiológica do alimento durante sua vida útil de prateleira e para evitar que o pH tenha um declínio muito rápido durante o período de armazenagem. O pH abaixo do indicado para alimento interfere na viabilidade das colônias probióticas, reduzindo assim a contagem das (BAL).

Tabela 7: Estatísticas descritivas do pH de acordo com os períodos avaliados e as temperaturas em relação a cada marca avaliada.

Marca	Temperatura	Prazo de validade				Valor P ²
		Durante		Após		
		Média±DP	Md	Média±DP	Md	
M1	5 °C	4,60±0,09	4,68	4,27±0,07	4,28	<0,001
	15 °C	3,87±0,51	3,92	2,73±0,19	2,70	<0,001
	Valor P ¹	<0,001		<0,001		
M2	5 °C	4,14±0,08	4,20	3,74±0,17	3,80	<0,001
	15 °C	3,86±0,25	3,90	3,14±0,09	3,15	<0,001
	Valor P ¹	0,001		<0,001		
M3	5 °C	3,58±0,37	3,75	2,81±0,24	2,95	<0,001
	15 °C	3,34±0,40	3,12	2,55±0,15	2,45	<0,001
	Valor P ¹	0,103		0,016		
M4	5 °C	4,26±0,07	4,30	3,57±0,32	3,60	<0,001
	15 °C	3,80±0,38	3,83	2,73±0,36	2,96	<0,001
	Valor P ¹	<0,001		<0,001		
M5	5 °C	2,76±0,27	2,90	2,17±0,06	2,20	<0,001
	15 °C	2,64±0,34	2,70	2,14±0,11	2,20	<0,001
	Valor P ¹	0,308		0,537		
M6	5 °C	3,34±0,22	3,25	2,86±0,05	2,90	<0,001
	15 °C	3,26±0,30	3,15	2,73±0,13	2,80	<0,001
	Valor P ¹	0,443		0,018		
M7	5 °C	3,77±0,15	3,80	2,80±0,39	2,96	<0,001
	15 °C	3,45±0,33	3,50	2,57±0,21	2,55	<0,001
	Valor P ¹	0,004		0,154		
M8	5 °C	3,35±0,11	3,45	3,06±0,05	3,10	<0,001
	15 °C	3,21±0,17	3,15	2,52±0,36	2,35	<0,001
	Valor P ¹	0,011		0,002		
M9	5 °C	3,14±0,02	3,15	3,00±0,15	3,10	0,013
	15 °C	3,01±0,12	3,00	2,43±0,16	2,35	<0,001
	Valor P ¹	0,002		<0,001		
M10	5 °C	4,26±0,03	4,28	4,01±0,10	4,00	<0,001
	15 °C	3,97±0,24	4,00	3,28±0,14	3,29	<0,001
	Valor P ¹	0,001		<0,001		
M11	5 °C	4,18±0,05	4,22	3,42±0,30	3,25	<0,001
	15 °C	3,72±0,34	3,72	3,06±0,11	3,00	<0,001
	Valor P ¹	<0,001		0,007		
M12	5 °C	3,25±0,08	3,30	3,00±0,00	3,00	– ³
	15 °C	3,19±0,24	3,13	2,71±0,14	2,75	<0,001
	Valor P ¹	0,371		– ³		

¹ Valor P referente ao teste t para amostras independentes a P<0,05. ² Valor P referente ao teste t para amostras pareadas a P<0,05. ³ Valor P não calculado devido à falta de variabilidade do pH após o prazo de validade a 5 °C (desvio padrão nulo).

Segundo Odamaki, et al. [50], o pH dos leites fermentados analisado em seu estudo, que tinha como principal objetivo melhorar a sobrevivência de bifidobactérias no leite fermentado, diminuiu cerca de 0,2 na primeira semana e consequentemente nas fases posteriores de armazenamento, comprovando que durante o tempo de armazenamento há uma diminuição significativa no pH. Casarotti, Carneiro e Penna [51], estudando após acidificação do leite fermentado armazenado em temperatura a 4 ° C por 28 dias, observaram que o pH diminuiu de 0,28 para 0,38 durante esse período de armazenamento, demonstrando que quanto maior o tempo de prateleira menor o pH. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, verificou-se que houve variação significativa do pH em relação ao tempo de prateleira em ambas as temperaturas de conservação (Tabela 7).

No entanto, Ramos, et al. [52], ao avaliar o pH de três formulações de bebidas lácteas durante 28 dias de armazenamento em temperatura de 4°C, observaram que todas as bebidas lácteas mantiveram pH sem grandes alterações, concluindo que é possível manter o pH ideal em temperaturas menores.

A legislação determina que as bebidas lácteas fermentadas para fim de comercialização deverão permanecer armazenadas em refrigeradores em temperatura não superior a 10°C, para que estas se mantenham viáveis ao consumo [24].

Já no presente estudo quando se restringe a comparação das temperaturas em relação ao período durante o prazo de validade, foi possível observar diferenças significativas no pH em 8 marcas: M1, M2, M4, M7, M8, M9, M10 e M11; sendo que, em todas elas, foi possível verificar menor pH na temperatura de 15 °C. Para as marcas M3, M5, M6 e M12, a temperatura não foi fator significativo para determinar menor pH, ou seja, não houve diferenças significativas entre o pH dos leites fermentados dessas marcas mencionadas quando as temperaturas de 5 °C e 15 °C foram comparadas.

Resultado semelhante foi possível de ser observado na comparação do pH em diferentes temperaturas em relação ao período após à validade. Para todas as marcas, exceto para as marcas M5 e M7, o pH foi significativamente inferior na temperatura de 15 °C quando comparado ao pH a 5 °C. Sendo assim,

tanto durante como após o prazo de validade, o pH de todos os leites fermentados avaliados foi significativamente inferior na temperatura de 15 °C.

Gonzalez-Olivares, et al. [53], concluíram que os leites fermentados armazenados em refrigeradores para serem comercializados, seguem um padrão em cascata, ou seja, quanto maior o tempo de prateleira, maior acidez, diminuindo assim o pH do produto, consequentemente reduzindo o número de bactérias ácido lácticas, as quais apresentam dificuldades em sobreviver em pH abaixo do ideal. Portanto é de suma importância que o leite fermentado seja consumido durante o período de validade, para evitar a ingestão deste produto em condições desfavoráveis ao consumidor.

Nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13 estão representados os valores individuais do pH, sendo as médias delimitadas pelos pontos em azul.

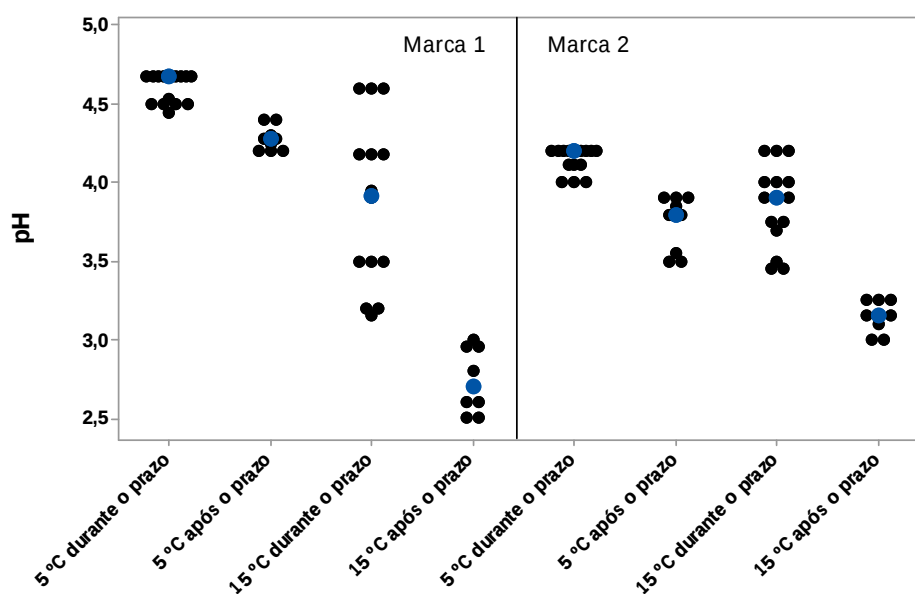


Figura 8: Distribuição do pH nas marcas 1 e 2 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

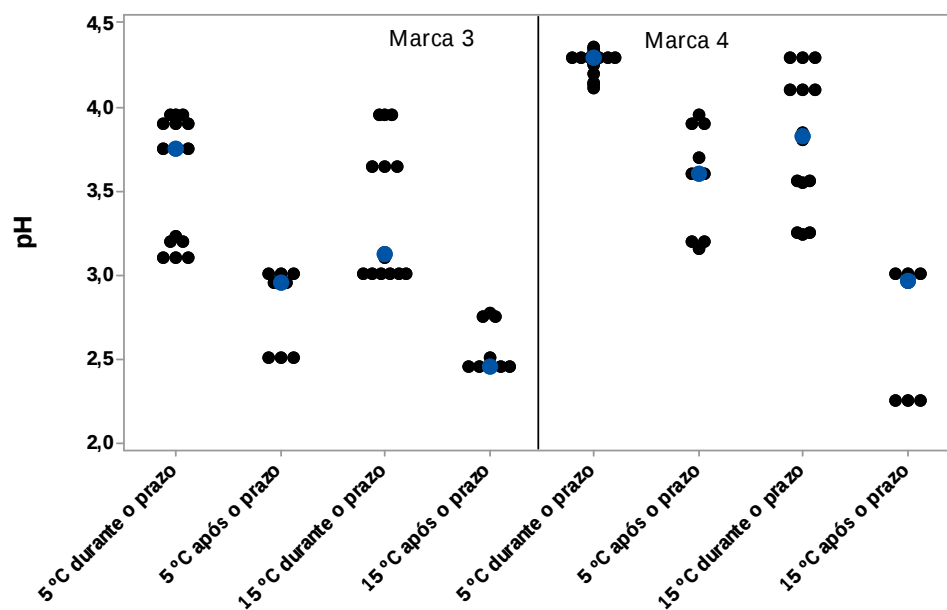


Figura 9: Distribuição do pH nas marcas 3 e 4 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

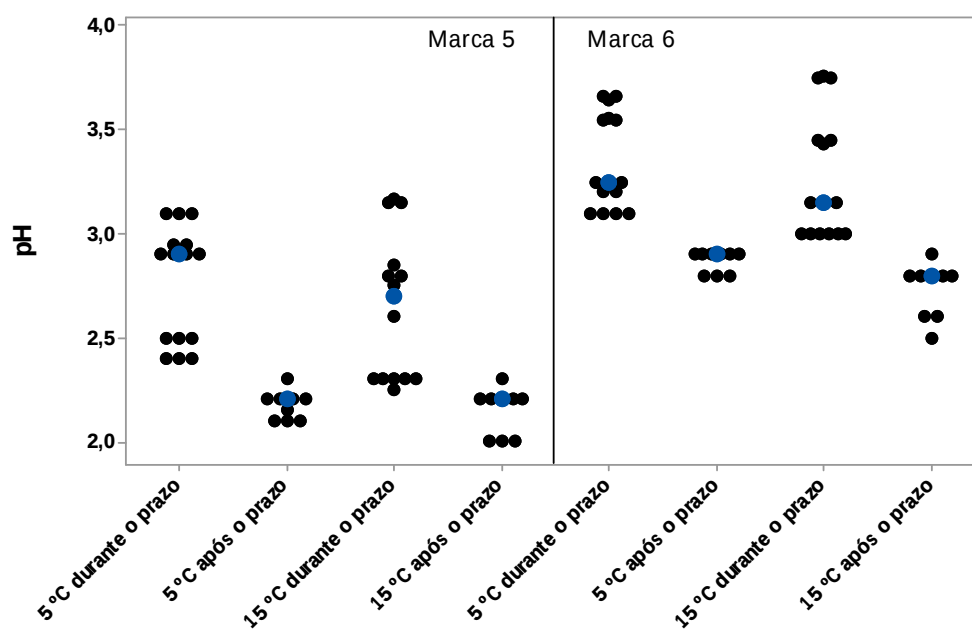


Figura 10: Distribuição do pH nas marcas 5 e 6 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

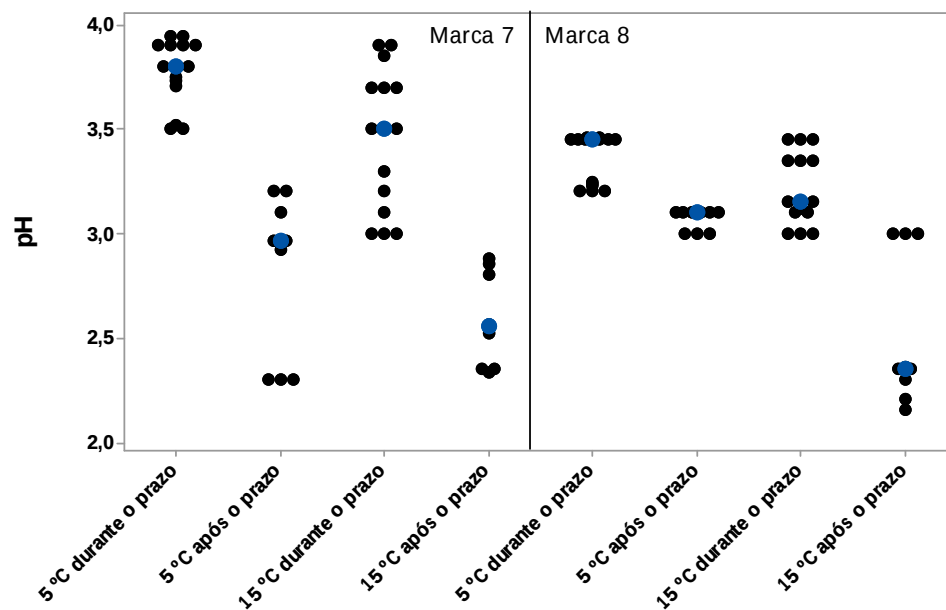


Figura 11: Distribuição do pH nas marcas 7 e 8 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

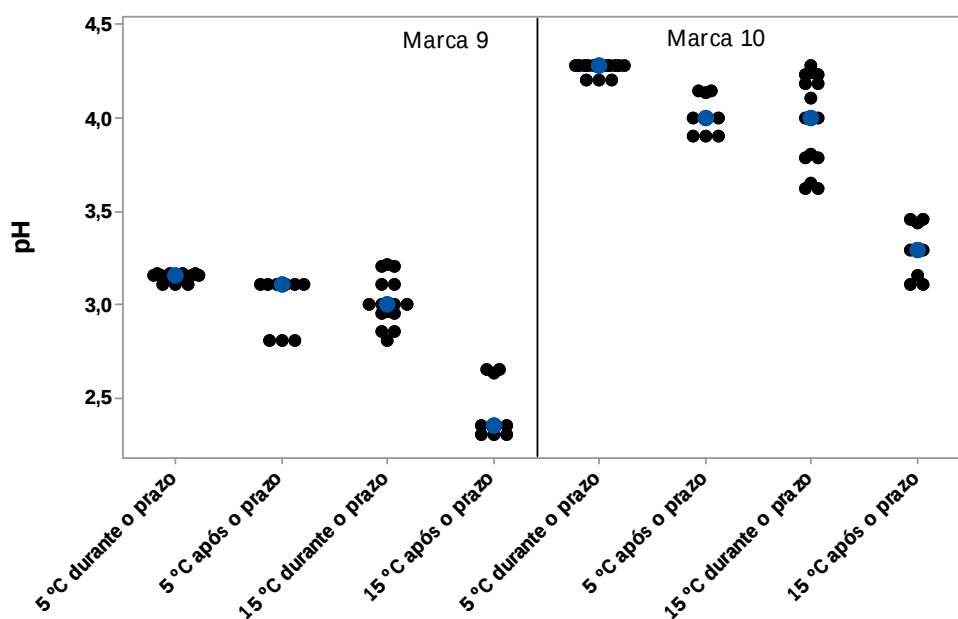


Figura 12: Distribuição do pH nas marcas 9 e 10 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

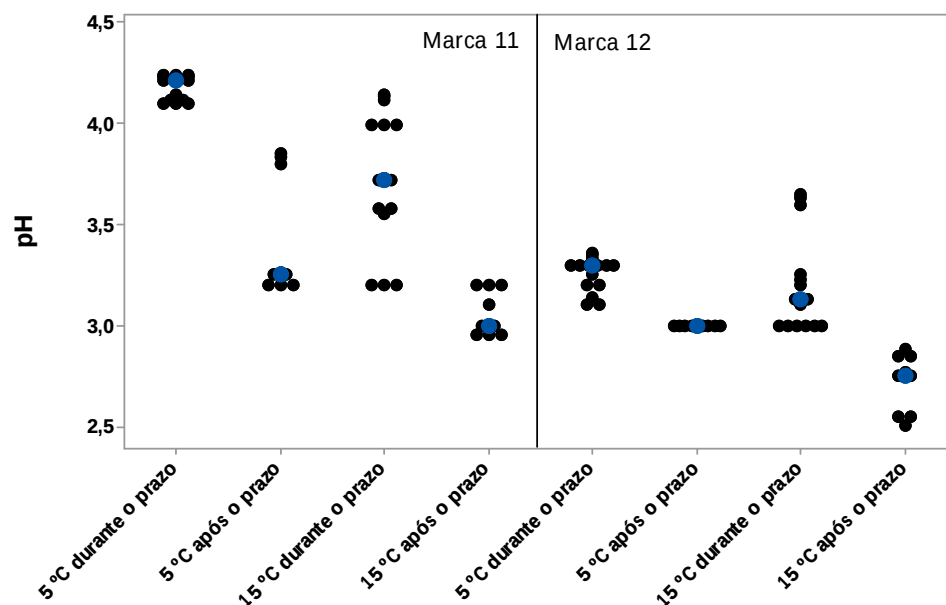


Figura 13: Distribuição do pH nas marcas 11 e 12 em ambas temperaturas e ambos os períodos.

A Tabela 8 apresenta os resultados da comparação do pH entre as marcas avaliadas de acordo com as temperaturas de conservação (5°C e 15°C). Os resultados indicam a presença de diferenças significativas entre o pH das marcas avaliadas tanto na temperatura de 5 °C como na temperatura de 15 °C ($p < 0,001$).

Tabela 8: Estatísticas descritivas do pH nas temperaturas de 5° C e 15° C em relação às marcas avaliadas durante o prazo de validade.

Temperatura	Marcas	pH		Valor P
		Média±DP ²	Md	
5 °C	M1	4,60±0,09 a	4,68	<0,001
	M2	4,14±0,08 b	4,20	
	M3	3,58±0,37 c	3,75	
	M4	4,26±0,07 b	4,30	
	M5	2,76±0,27 f	2,90	
	M6	3,34±0,22 d	3,25	
	M7	3,77±0,15 c	3,80	
	M8	3,35±0,11 d	3,45	
	M9	3,14±0,02 e	3,15	
	M10	4,26±0,03 b	4,28	
	M11	4,18±0,05 b	4,22	
	M12	3,25±0,08 de	3,30	
15 °C	M1	3,87±0,51 a	3,92	<0,001
	M2	3,86±0,25 a	3,90	
	M3	3,34±0,40 cde	3,12	
	M4	3,80±0,38 ab	3,83	
	M5	2,64±0,34 f	2,70	
	M6	3,26±0,30 de	3,15	
	M7	3,45±0,33 bcd	3,50	
	M8	3,21±0,17 de	3,15	
	M9	3,01±0,12 ef	3,00	
	M10	3,97±0,24 a	4,00	
	M11	3,72±0,34 abc	3,72	
	M12	3,19±0,24 de	3,13	

¹ Valor P referente ao teste de Análise de Variância a P<0,05. ² Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey a P<0,05.

Para a temperatura de 5 °C, as marcas M1, M2, M4, M10 e M11 apresentaram maiores valores de pH (acima de 4,0), a marca M5 foi a única que apresentou pH abaixo de 3,0 e as demais marcas (M3, M6, M7, M8, M9 e M12) apresentaram valores de pH intermediários, na faixa entre 3,0 e 4,0. Dentre as amostras com maior pH (acima de 4,0), a amostra M1 foi a que apresentou valor significativamente superior em relação às demais (Figura 14).

Para a temperatura de 15 °C, não houve marcas com valores de pH acima de 4,0, sendo a marca M5 a única que apresentou pH abaixo de 3,0, as demais apresentaram valores de pH intermediários. Dentre as marcas com valores de pH intermediário (entre 3,0 e 4,0), as marcas M1, M2 e M10 apresentaram valores de pH superiores, seguidas das marcas M4 e M11 (Figura 14).

Liu et al. [54], avaliaram a capacidade de sobrevivência de 29 espécies de microrganismos, em condições de pH baixo, e constataram que vinte e cinco espécies (86%) foram capazes de crescer bem em pH 3,0 durante 3 h; no entanto, apenas 7 destas podia tolerar acidez inferior a pH 2,0 durante 3 h. Quando mais testes foram realizados, apenas 4 das 7 cepas apresentaram-se melhor tolerância à acidez, demonstrando que quanto menor o pH, menor as chances de sobrevivência das bactérias. Pelos resultados obtidos na presente pesquisa verificou-se que a maioria das marcas avaliadas apresentaram pH intermediários (entre 3,0-4,0), tanto na temperatura de 5 °C como na temperatura de 15 °C, possibilitando assim a sobrevivência dos microrganismos.

Wang, et al. [55], estudando as características de fermentação e tolerância dos *Lactobacillus casei*, presentes nos leites fermentados de soja e bovino, durante o armazenamento, verificaram diminuição contínua do pH em ambos os leites, durante o tempo de prateleira, também uma maior acidificação, devido à produção contínua de ácido láctico, essa pós acidificação, pode ter provocado a redução do pH para valores abaixo de 4,0, sendo que um pH muito baixo influencia de forma negativa na sobrevivência dos microrganismos, acarretando um declínio acentuado no número de bactérias lácteas viáveis.

Thu, Tuan e Van [47], afirmam que além do tempo de armazenamento, o pH do leite fermentado também pode sofrer mudanças dependendo das espécies de microrganismos probióticos empregadas no produto, o qual foi observado no presente estudo (Tabela 8 e Figuras 14 e 15). Verificou-se que, quanto maior o tempo de prateleira maior o efeito sobre a acidez do leite fermentado.

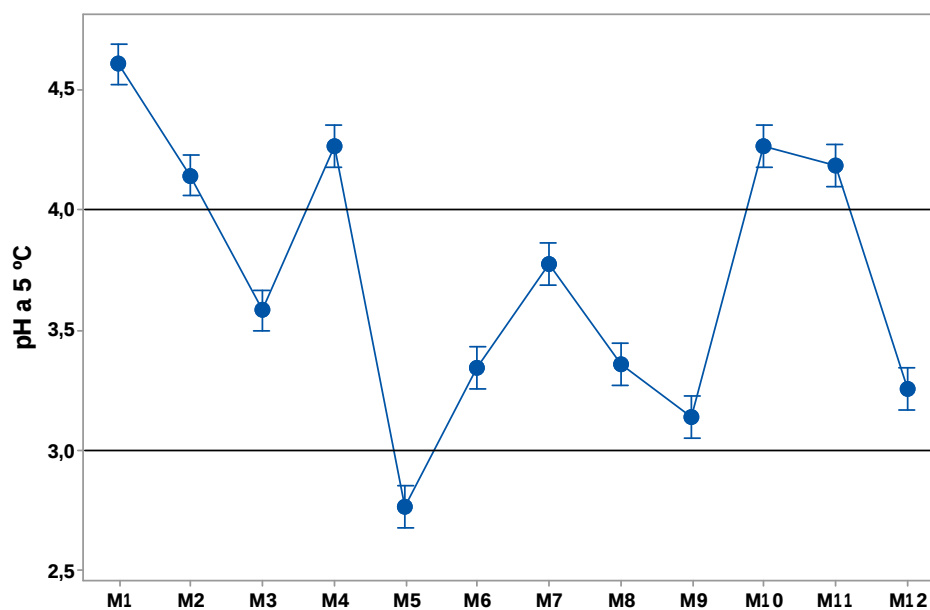


Figura 14: Distribuição do pH na temperatura de 5 °C considerando o tempo durante o prazo de validade de todas as marcas avaliadas.

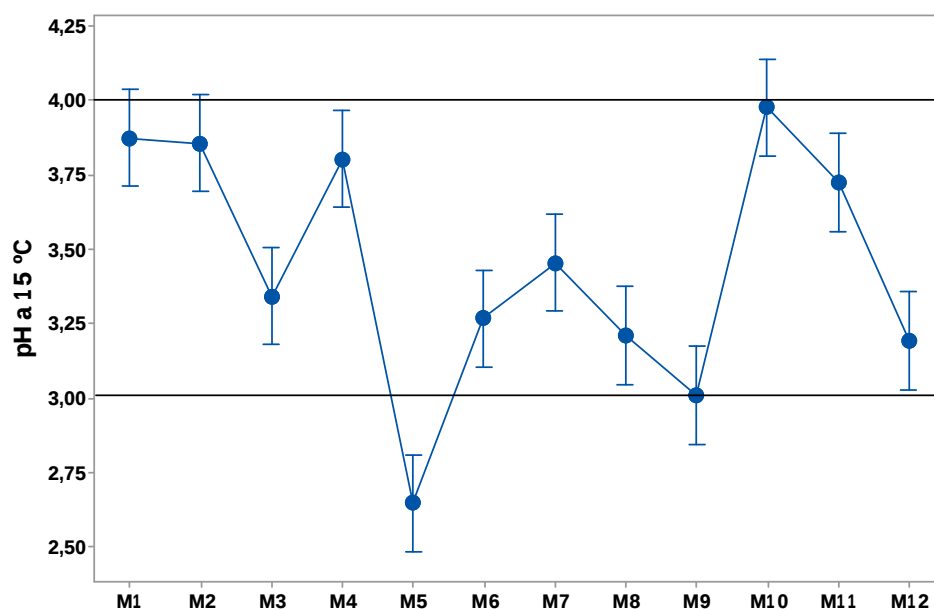


Figura 15: Distribuição do pH na temperatura de 15 °C considerando o tempo durante o prazo de validade de todas as marcas avaliadas.

5- CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e pelos resultados obtidos verificou-se, durante o período de validade, que algumas marcas de leite fermentado apresentaram concentrações de microrganismos inferiores ao mínimo preconizado pela legislação, como a marca M5 que apresentou menor viabilidade, seguido das marcas M7, M8, M9 e M12. Além disso, houve uma diminuição significativa na quantidade de bactérias lácticas probióticas, conforme a progressão do tempo de prateleira, indicando que o consumo de tais produtos deve obedecer a data de vencimento estipulada.

As análises demonstraram que tanto a temperatura de conservação, quanto o pH e o tempo de prateleira, influenciam diretamente na viabilidade das bactérias lácticas, e a diminuição do pH dos leites fermentados está diretamente relacionado com tempo de prateleira e com a temperatura de conservação.

Diante disso, conclui-se que os leites fermentados devem ser armazenados em temperaturas abaixo de 10°C, de acordo com a legislação vigente, para melhor viabilidade e conservação do pH. Para que seus benefícios e suas funcionalidades probióticas sejam atingidas, esses produtos devem ser consumidos dentro do prazo de validade, evitando assim, quaisquer desconfortos à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GON R L R. Aplicação e Viabilidade de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* E *S. thermophilus* Microencapsulados em *Frozen Yogurt* de Soja. 2014. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2247/1/CM_COEAL_2013_2_10.pdf>. Acesso em: maio 2016.
2. NÓBREGA FJ. O que você quer saber sobre Nutrição – Perguntas e respostas comentadas. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2014. 832p.
3. PINTO S S. Efeito da adição de bifidobacterium BB-12 microencapsulada sobre propriedades de *frozen* iogurte. In: Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis: UFSC, 2012.
4. WANG S, ZHU H, LU C, KANG Z, LUO Y, Feng L, Lu X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. American Dairy Science Association; 95:4813–4822, 2012. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&vid=22&hid=118>>. Acesso em: jul. 2016.
5. PATEL R, DUPONT H L. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. Clinical Infectious Diseases; 60(Suppl 2): S108-121, 2015. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&vid=11&hid=118>>. Acesso em: jul. 2016.
6. BAGAROLLI R A. O intestino e a sua microbiota. Notícias Galena. São Paulo, v.166, n. 24, p.08-11, 2014.
7. MENEZES C R, BARIN J S, CHICOSKI A J, ZEPKA L Q, LOPES E J, FRIES L L M, TERRA N N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. Santa Maria: Ciencia Rural, v.43, n.7, p. 1309-1316, 2013.
8. CUPPARI L. (coord.). Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2007. cap.2, p.71-85.
9. VITOLO M R. Obesidade- Prevalência, Etiologia e Tratamento. In: VITOLO, M. R. Nutrição da Gestação ao Envelhecimento. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. cap. 43, p. 417-427.
10. ANVISA, Agência Nacional DE Vigilância Sanitária: Resolução n.18, de 30/04/1999, Brasília, DF, 1999, não paginado. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/18_99.htm>. Acesso em: dez. 2015.

11. ARABBI PR. "Alimentos funcionais: aspectos gerais" São Paulo, 1999, p,71-111.
12. RODRIGUES L R, TEIXEIRA J A, OLIVEIRA R. Lowcost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, n. 32, n. 3, p. 135-142, 2006. Disponível em: <[http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/5814/1/BEJ-Rodrigues2\[1\].pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/5814/1/BEJ-Rodrigues2[1].pdf)>. Acesso em: jan 2016.
13. GERHARDT A, MONTEIRO BW, GENNARI A, LEHN D N, SOUZA CFV. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.68, n.390, p. 41-49, 2013. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/7>>. Acesso em: fev. 2016.
14. THAMER K G, PENNA A L B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/44070>>. Acesso em: jan 2016.
15. GRANDI A Z, ROSSI D A. Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 62-68, 2010. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/issue/view/478>> Acesso em: fev. 2016.
16. CUNHA T M, ILHA E C, AMBONI R D M C, BARRETO P L M, CASTRO F P. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 12, n. 1, p. 23-33, 2009. Disponível em: <www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v12n1349a.pdf>. Acesso em: jan. 2016.
17. NAVES A. Fisiopatologia e regulação funcional da obesidade. In: SILVA S M C, MURA J DP. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014. cap. 37, p. 655-669.
18. BRANCHER J S. Uso de probióticos no tratamento da obesidade: uma revisão sistemática. 2014.66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em:<<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/108988>>. Acesso em fev. 2016.
19. MACHADO A S. Importância da microbiota intestinal para a saúde humana, enfocando nutrição, probióticos e disbiose. 2008. 33 f. Monografia (Especialização em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. Disponível em:<<http://www.microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/62.PDF>>. Acesso em fev. 2016.

20. PASCHOAL V. Nutrição Clínica Funcional: dos princípios à prática. 2. ed. São Paulo, SP: Valéria Paschoal Editora Ltda.; 2007. 144-149p.

21. CORREIA S da S. PERCEGONI, N. Microbiota intestinal e ganho de peso corporal- uma revisão. 2014. 18 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/gradnutricao/files/2015/03/MICROBIOTA-INTESTINAL-E-GANHO-DE-PESO-CORPORAL-UMA-REVISAO%83O.pdf>>. Acesso em: jan. 2016.

22. HAIAT P D. Desequilíbrio funcional na obesidade: uma doença Nutri-neuro-imuno-endócrino-metabólica- Obesidade e intestino. In: NAVES, A. Nutrição Clínica Funcional: obesidade. 2 ed. São Paulo: VP Editora, 2014. cap. 4, p. 203-238.

23. OLIVEIRA R P S, FLORENCE A C R, 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, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 1-6, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144608>>. Acesso em: mai 2016.

24. BRASIL. Ministério DA Agricultura, Pecuária E Abastecimento: Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, nº 46, de 23 de outubro de 2007 Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: mar. 2016.

25. METGHNIKOF E. Études sur la flore intestinale-Deuxième mémoire. Annales de l'Institut Pasteur : journal de microbiologie, Paris; v.24, p. 755-770,1910. Disponível em: <<http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5835955c/f1.image>>. Acesso em fev. 2016.

26. EWASCHUK J B, DIELERMAN L A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol; v. 12, nº 37, p 5941-50, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124400/>>. Acesso em: jan. 2016.

27. BRANDT K G, SAMPAIO M M S C, MIUKI C J. Importância da microflora intestinal. Pediatria, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-127, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/pdf/1167.pdf>>. Acesso em: mar. 2016.

28. PASTEUR L, JOUBERT J F. Charbon et septicémie. C R Soc Biol Paris; 85: 101-15, 1877. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/en/institut-pasteur/history/louis-pasteur/louis-pasteur-s-work/final-years-1877-1887>>. Acesso em: dez. 2015.

29. PISTELLI G C, COSTA C E M. Bactérias intestinais e obesidade. *Revista Saúde e Pesquisa*, São Paulo, v.3, n.1, p.115-119, jan./abr. 2010. Disponível em<<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/1412/1046>>. Acesso em: mar. 2014.

30. ALMEIDA L B, MARINHO C B, SOUZA C S, CHEIB V B P. Disbiose intestinal. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. Belo Horizonte, v. 24, n.1, p. 58-65, dez. 2008. Disponível em: <<http://nutricore.com.br/app/webroot/img/bibliotecas/disbiose%2ointestinal.pdf>>. Acesso em: mar. 2016.

31. BEDANI R, ROSSI E A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. *Jornal Português de Gastreenterologia*. Lisboa, v. 16, n.1, p.19-28, jan.-fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-81782009000100003>. Acesso em: dez. 2015.

32. LAGE D G, BRITO G A P. A relação da microbiota intestinal com obesidade e resistência à insulina. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, São Paulo, v. 6, n. 31, p. 31-34, jan./fev. 2012. Disponível em: <<http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/189/188>>. Acesso em: mar. 2016.

33. ANJO D FC. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal vascular brasileiro*. Jaraguá do Sul, v. 3, n.2, p. 145-154, jun. 2004. Disponível em: < <http://jornalvascularbrasileiro.com.br/04-03-02/04-03-02-145/04-03-02-145.pdf> >. Acesso em: fev. 2016.

34. WENUS C, GOLL R, LOKEN E B, BIONG A S, HALVORSEN D S, FLORHOLMEN J. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *European Journal of Clinical Nutrition*: 62, 299–301, 2008. Disponível em:<<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=26&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118> >. Acesso em: jul. 2016.

35. LAMMERS K M, VERGOPOULOS A, BABEL N. et al. Probiotic Therapy in the prevention of pouchitis onset decreaset interleukin-I beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. *Inflamm Bowel Dis*; 11(5); 447-54, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867584>>. Acesso em: fev. 2016.

36. O´SULLIVAN M A, O´MORAIN C A. Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomized double-blind placebo-cocontrolled crossover study. *Dig Liver Dis*; 32(4); 294-301, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515626> >. Acesso em: mar. 2016.

37. NIEDZIELIN K, KONDECKI H, BIRKENFELD B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 13(10); 1135-6,

2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711768> >. Acesso em: mai 2016.
38. BAZZOCCHI G, GONCHETTI P, ALMERIGI P F. et al. Intestinal microflora and oral bacteriotherapy in irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis*; 34(Suppl 2): S48-53, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408440> >. Acesso em: fev. 2016.
39. SAAD S N I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, vol. 42, n. 1, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n1/29855.pdf>>. Acesso em: fev 2016.
40. BAGAROLLI R A. A epidemia da obesidade. *Notícias Galena*. São Paulo, v.166, n. 24, p. 06-07, 2014.
41. SPEZIA G, SILVA L T, SANTOS S P, LIBERALI R, NAVARRO F. Micro biota intestinal e sua relação com a obesidade. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, São Paulo, v. 3, n. 15, p. 260-267, mai./jun. 2009. Disponível em: <<http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/155/152>>. Acesso em: fev. 2016.
42. APHA-American Public Health Association. Standard methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association; 2004.
43. SILVA N, JUNQUEIRA V C A, SILVEIRA N F A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 4ª Edição. São Paulo: Editora Varela, 2010.
44. PEREIRA A M, ALMEIDA M D, SAUER E. Avaliação da concentração de bactérias lácticas viáveis em iogurtes com polpa de frutas. *Série Ciênc Tecnol Alim: Desenv Tecnol Alim*. 2007;1:7-13.
45. VARGA L, SÜLE J, NAGYT P. Short communication: Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 4, p. 2039–2044, 2014. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=27&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118> >. Acesso em: jul. 2016.
46. SOUZA TC, ZACARÍAS M F, SILVA A M, BINETTI A, REINHEIMER J, NICOLI J R, VINDEROLA G. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of Applied Microbiology*, Santiago del Estero, Argentina, v.112, p. 1184–1192, 2012. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=34&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118> >. Acesso em: jul. 2016.

47. THU D T A, TUAN C N, VAN N T X. Studying of The Viability of Selected Probiotics in Soy Milk to Develop A Functional Beverage Product. International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology, v.5, n. 6, p. 481-487, 2015. Disponível em: <www.researchgate.net/publication/289494869_Studying_of_The_Viability_of_Selected_Probiotics_in_Soy_Milk_to_Develop_A_Functional_Beverage_Product>. Acesso em: jul. 2016.
48. OLIVEIRA M N, SIVIERI K, ALEGRO J H A, SAAD S M I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, vol. 38, n. 1, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151693322002000100002&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: jun 2016.
49. HUNGRIA TD, LONGO PL. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida-de-prateleira. Revista Saúde. São Paulo, v. 3, n. 3, p.10-15. 2009. Disponível em: <<http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/viewArticle/477>>. Acesso em: jul. 2016.
50. ODAMAKI T, XIAO J Z, YONEZAWA S, YAESHIMA T, IWATSUKI K. Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. American Dairy Science association. Japan. v.94, p. 1112–1121, 2011. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=33&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118>>. Acesso em: jul. 2016.
51. CASAROTTI S N, CARNEIRO B M, PENNA A L B. Evaluation of the effect of supplementing fermented milk with quinoa flour on probiotic activity. American Dairy Science association. São José do Rio Preto, v. 97, p. 6027–6035, 2014. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=28&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118>>. Acesso em: jul. 2016.
52. RAMOS A C S M, STAMFORD T L M, MACHADO E C L, LIMA F R B, GARCIA E F, ANDRADE S A C, SILVA C G M. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas, Revista de Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2817-2828, 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/13815/0>>. Acesso em: jul. 2016.
53. GONZALEZ-OLIVARES LG, ANORVE–MORGA J, NEDA-OVANDO A C, CONTRERAS-LOPE E, JAIMEZ-ORDA J. Peptide separation of commercial fermented milk during refrigerated storage. Food Science and Technology, Campinas, 34(4): 674-679, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612014000400005&script=sci>>. Acesso em: Jul 2016.

54. LIU W J, CHEN Y F, KWOK L Y, LI M H, SUN T, SUN C L, WANG X N, MENGHEBILIGE TD, ZHANG H P, SUN T S. Preliminary selection for potential probiotic *Bifidobacterium* isolated from subjects of different Chinese ethnic groups and evaluation of their fermentation and storage characteristics in bovine milk. American Dairy Science Association, China, v. 96, p. 6807–6817, 2013. Disponível em:

<<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=44&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118>>. Acesso em: jul 2016.

55. WANG J, GUO Z, ZHANG Q, YAN L, CHEN W, LIU X-M, ZHANG H-P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. American Dairy Science Association, China, v. 92, p. 2468–2476, 2009. Disponível em:

<<http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=45&sid=45e92c2e-ead7-457d-a13c-1eaa5b8fd699%40sessionmgr105&hid=118>>. Acesso em: jul. 2016.