

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**ANDRESA MARTINS FRAGOSO
SUELYN BOMFIM NIGELSKI
TATIANE BOVAROTI**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOBREMESA LÁCTEA
CREMOSA POTENCIALMENTE PROBIÓTICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PONTA GROSSA
2012**

ANDRESA MARTINS FRAGOSO

SUELYN BOMFIM NIGELSKI

TATIANE BOVAROTI

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOBREMESA LÁCTEA
CREMOSA POTENCIALMENTE PROBIÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de trabalho de diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos- da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, como requisito parcial para obter o título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Milleo de Almeida

PONTA GROSSA

2012



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA POTENCIALMENTE PROBIOTICA

por

**ANDRESA MARTINS FRAGOSO
SUELYN BONIFIM NEIGLSKI
TATIANE BOVAROTI**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 21 de junho de 2012 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Denise Milléo Almeida
Professora Orientadora

Prof. Me. Luis Alberto Chavez Ayala
Membro titular

Profa. Dra. Eliana Aparecida Fagundes Queiroz Bortolozo
Membro titular

RESUMO

Devido à crescente procura do consumidor por alimentos que sejam saudáveis e de fácil consumo, a indústria de laticínios vem se preocupando em atender esse interesse adicionando em seus produtos prontos para consumo, culturas probióticas. Pesquisas demonstram que alguns produtos lácteos, podem ser veículos adequados para microrganismos probióticos, dentre os produtos pode se destacar as sobremesas lácteas. O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade da sobremesa láctea cremosa potencialmente probiótica, adicionada da cepa *Lactobacillus acidophilus* La-5, durante o período armazenamento refrigerado. A estabilidade da sobremesa foi avaliada durante 28 dias de armazenamento utilizando métodos instrumentais, microbiológicos e físico-químicos. A contagem média do número de células viáveis do *Lactobacillus acidophilus* permaneceu entre $2,0 \times 10^9$ a $2,2 \times 10^8$ a UFC/120g durante o armazenamento. A resistência da cultura láctea foi avaliada após seis horas de exposição ao sistema gastrointestinal em pH 2,0 e pH 4,0, apresentando média global de sobrevivência de 71,61% e 97,79%, respectivamente. Quanto à estabilidade físico-química da sobremesa, para todos os parâmetros analisados somente a acidez total titulável não apresentou variação significativa. Diante dos resultados obtidos, se torna viável o desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa como alimento funcional, uma vez que o produto atendeu as exigências da legislação e contemplam com as expectativas dos consumidores por produtos simultaneamente práticos e saudáveis.

Palavras-chave: Probiótico. *Lactobacillus acidophilus*. Sobremesa láctea. Sistema gastrointestinal.

ABSTRACT

Due to increasing consumer demand for foods that are healthy and easy to use, the dairy industry is worrying to meet this interest in adding your products ready for consumption, probiotic cultures. Research shows that some dairy products, may be suitable vehicles for probiotic microorganisms, among the products can highlight the dairy desserts. The objective of this study was to evaluate the stability of the creamy dessert potentially probiotic milk, added strain *Lactobacillus acidophilus* La-5, during refrigerated storage. The stability of the dessert was evaluated during 28 days of storage using instrumental methods, microbiological and physico-chemical. The average count of the number of viable cells of *Lactobacillus acidophilus* were between 2.0×10^9 to 2.2×10^8 to UFC/120g during storage. The culture of lactic acid resistance was evaluated six hours after exposure to gastrointestinal system at pH 2.0 and pH 4.0, with an average overall survival of 71.61% and 97.79% respectively. As for the physical and chemical stability of the dessert, for all parameters analyzed only the total acidity did not change significantly. Based on these results, it becomes feasible to develop dessert creamy milk as functional food, since the product has met the requirements of legislation and come with the expectations of consumers for products both practical and healthy.

Keywords: Probiotic. *Lactobacillus acidophilus*. Dessert milk. Gastrointestinal system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

EQUAÇÃO 1- Equação da população celular	22
EQUAÇÃO 2- Equação para determinação do índice de sobrevivência da cepa lática ao sistema gastrointestinal	25
EQUAÇÃO 3- Equação para determinação do índice de saturação	26
EQUAÇÃO 4- Equação para determinação do índice de tonalidade	26
FIGURA 1- Simulação da resistência <i>in vitro</i> do <i>Lactobacillus acidophilus</i> ao sistema gastrointestinal durante seis horas sob agitação e aquecimento	24
GRÁFICO 1- Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 na sobremesa durante os dias de armazenamento	27
GRÁFICO 2- Índice de sobrevivência do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 frente ao sistema gastrointestinal em pH 2,0	29
GRÁFICO 3- Índice de sobrevivência do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 frente ao sistema gastrointestinal em pH 4,0	30
QUADRO 1- Principais compostos funcionais investigados pela ciência	12
QUADRO 2- Exemplos de cepas de probióticos em produtos	15
QUADRO 3- Lista de ingredientes utilizados na obtenção da sobremesa	22
QUADRO 4- Lista de componentes utilizados na obtenção do suco gástrico	23
TABELA 1- Lista de componentes utilizados na obtenção do suco intestinal	21
TABELA 2- Média global do índice de sobrevivência em pH 2,0 e pH 4,0 ao longo do período de 28 dias.....	31
TABELA 3- Médias das análises físico químicas	32
TABELA 4- Parâmetros de cor: luminosidade (L*) e coordenadas de cromaticidade (a*e b*) da sobremesa láctea cremosa	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 PRODUTOS LÁCTEOS	10
3.1.1 Características do Mercado.....	10
3.2 SOBREMESAS LÁCTEAS	11
3.3 PRODUTOS LÁCTEOS COMO ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	12
3.4 PROBIÓTICOS	14
3.5 <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i>	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAL	20
4.2 MÉTODOS	20
4.2.1 Recuperação e preparo da cultura lática.....	20
4.2.2 Obtenção da sobremesa láctea cremosa	21
4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA SOBREMESA DURANTE ARMAZENAMENTO	21
4.3.1 Avaliação da viabilidade celular	22
4.3.2 Resistência <i>in vitro</i> do <i>L. acidophilus</i> ao sistema gastrointestinal (SGI).....	22
4.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA	25
4.5 ANÁLISE DOS DADOS	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 RECUPERAÇÃO DA CULTURA LÁTICA	27
5.2 OBTENÇÃO DA SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA.....	27
5.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO <i>L. ACIDOPHILUS</i> NOS DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO	27
5.4 RESISTÊNCIA DO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS IN VITRO</i> AO SISTEMA GASTROINTESTINAL	28
5.5 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA DURANTE O ARMAZENAMENTO	32
6 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiador, à medida que se procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, sejam práticos, atrativos e principalmente saudáveis (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Nos últimos cinco anos, o consumo de alimentos saudáveis no Brasil quase dobrou, passando de R\$ 15,9 bilhões, em 2004, para R\$ 28,9 bilhões em 2009, um crescimento de 82%. A projeção é que até 2014 o consumo desses alimentos cresça outros 39% e chegue aos R\$ 39,2 bilhões. Um estudo divulgado pelo Euromonitor Internacional considerou saudáveis os produtos *diet e light*, alimentos funcionais, orgânicos e produtos específicos para quem tem intolerância a certos tipos de alimentos (MATIAS, 2010).

Os alimentos funcionais são alimentos ou ainda ingredientes que por sua composição química, produzem no corpo humano efeitos fisiológicos ou metabólicos considerados benéficos e que contribuem para a saúde do organismo e a prevenção de doenças ao mesmo tempo em que satisfazem as necessidades básicas nutricionais de um indivíduo (AUGUSTO, 2010).

A indústria de lácteos tem respondido ao interesse dos consumidores em alimentos funcionais melhorando os já saudáveis atributos do leite, iogurte e queijos com componentes específicos, fisiologicamente ativos. Entre os componentes incluem os probióticos (SANTIN, 2008).

Os produtos contendo microrganismos probióticos representam um segmento de grande crescimento, com intenso investimento em pesquisa, principalmente para o desenvolvimento de produtos lácteos probióticos, sendo as espécies *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.* as mais empregadas (OLIVEIRA, 2010).

Os microrganismos probióticos são geralmente introduzidos em leites fermentados, iogurtes, sobremesas lácteas, sorvetes e queijos. Para o desenvolvimento de um alimento probiótico, aspectos tecnológicos devem ser considerados, tais como a composição e o processamento do alimento, a viabilidade da cultura e as condições de armazenamento do produto final (BRANDÃO, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade de sobremesa láctea cremosa potencialmente probiótica durante armazenamento refrigerado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a viabilidade da cepa *Lactobacillus acidophilus* La-5 em sobremesa láctea cremosa, durante período de armazenamento refrigerado.
- Avaliar a tolerância *in vitro* do *Lactobacillus acidophilus* La-5 na matriz alimentar, frente ao sistema gastrointestinal.
- Verificar a estabilidade físico-química, da sobremesa obtida durante 28 dias de conservação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUTOS LÁCTEOS

Segundo os Padrões de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos, Resolução nº 2 de 22 de maio de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, produto lácteo é o produto obtido mediante processamento tecnológico do leite, podendo conter apenas aditivos alimentares e outros ingredientes funcionalmente necessários para o processamento.

São considerados produtos lácteos: sobremesa láctea, leite aromatizado, bebida láctea, creme de leite, leites fermentados, requeijão, queijo, ricota, iogurte, manteiga e sorvete (PORCENTAGEM, 2008).

3.1.1 Características do Mercado

De acordo com Lausanne (2011), um estudo global que acompanha os fatos, números e tendências na indústria de laticínios, prevê um aumento de cerca de 30% no consumo de leite e produtos lácteos líquidos, segundo a pesquisa, a demanda global por leite branco, leite aromatizado, iogurte, leite condensado, leites acidificados e leite infantil deverá crescer para cerca de 350 bilhões de litros em 2020.

A demanda por leite e derivados pode ser aumentada por diversos fatores, entre eles o aumento da população, crescimento de renda, redução de preços de produtos concorrentes ou substitutos, e mudanças nos hábitos alimentares (NEGREIROS, 2009).

De acordo com Dennis Jönsson, Presidente e *Chief Executive Officer* (CEO) da Tetra Pak, as recentes mudanças demográficas trazem que os consumidores se mostram cada vez mais atarefados, bem informados e preocupados com a saúde. “Nesta última década há uma procura por conveniência, qualidade e segurança. Esses fatores estimulam o consumo de leite industrializado nos países em desenvolvimento” (LAUSANNE, 2011).

Nos últimos meses de 2011, o preço dos produtos lácteos sofreu um aumento de 3,3%, segundo uma pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que comparou o preço dos derivados entre abril de 2010 a abril de 2011.

Mesmo com a alta, os consumidores não pararam de adquirir os produtos (JÚNIOR, 2011).

A procura por alimentos práticos, funcionais e com características bem definidas, apresenta um crescimento no mercado mundial de produtos lácteos. Dentre estes produtos estão às sobremesas lácteas que se caracterizam como leite gelificado aromatizado (CLEMENTINO; NASCIMENTO; CORREIA, 2008).

No ano de 2009, foi registrado um crescimento de mais de 30% em volume, em comparação com o ano anterior de sobremesas lácteas cremosas da Danone, sendo que a marca se consolidou na liderança do segmento em 2010 (DANETTE..., 2011). A empresa Nestlé tem um mercado que movimenta 22 mil toneladas ao ano e mais de R\$ 200 milhões na categoria de sobremesas refrigeradas e ainda possui um grande potencial de crescimento (BOURROUL, 2008).

3.2 SOBREMESAS LÁCTEAS

As sobremesas lácteas prontas para consumir, com a média na vida de prateleira, apresentaram importante crescimento nas últimas décadas. Os ingredientes inovadores e os sistemas tecnológicos aplicados nas fábricas de laticínios têm proporcionado novas alternativas às sobremesas lácteas clássicas feitas em casa, permitindo a produção de sobremesas com novos sabores, com maior digestibilidade e maior valor nutritivo (NIKAEDO; AMARAL; PENNA, 2004).

São basicamente constituídas por leite, amido, açúcar, flavorizantes, estabilizantes, emulsificantes, geleificantes, espessantes, corantes, aromatizantes, ovos, polpas de frutas ou chocolate e conservantes, com formulações variáveis em função das combinações dos ingredientes utilizados (MERCER *et. al*, 2008). Sua composição difere quanto aos ingredientes e concentrações empregadas, bem como modo de preparo (ZIEGLER; AUGUSTO, 2006).

De maneira geral, estes produtos são complexos, cuja estabilidade depende muito da tecnologia de fabricação, das características intrínsecas de cada produto e da estocagem sob condições refrigeradas (MERCER *et al.*, 2008).

Dentre as sobremesas lácteas mais comuns destacam-se: iogurte congelado (*frozen yogurt*); *queijo petit suisse*; pudim; cremes gelados; *mousse* e flans (AS DIFERENÇAS...,2011).

3.3 PRODUTOS LÁCTEOS COMO ALIMENTOS FUNCIONAIS

Segundo a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que trata do Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos “Propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”.

Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, produzem efeitos metabólicos, fisiológicos ou trazem benefícios à saúde, além de suas funções nutricionais básicas. Este efeito ocorre em sua maioria quando estes são consumidos como parte de uma dieta usual, eles devem ser seguros para consumo sem supervisão médica, sua eficácia e segurança devem ser asseguradas por estudos científicos (CARDOSO; OLIVEIRA, 2008).

Os principais alimentos funcionais são: fibras, ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 fitoquímicos, peptídeos ativos (arginina e glutamina), prebióticos (inulina e oligofrutose ou frutooligossacarídeo), e os probióticos (lactobacilos acidófilos, casei, bulgárico e lactis) (PADILHA; PINHEIRO, 2004).

O Quadro 1 apresenta os principais compostos funcionais investigados pela ciência.

COMPONENTES ATIVOS	PROPRIEDADES BENÉFICAS	ALIMENTOS FUNCIONAIS QUE CONTEM O COMPONENTE
Isoflavonas	Ação estrogênica (reduz sintomas menopausa)	Soja e derivados
Proteínas de soja	Redução dos níveis de colesterol	Soja e derivados
Ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA)	Redução do LDL-colesterol; ação anti-inflamatória. Indispensável para o desenvolvimento do cérebro e retina de recém nascidos	Peixes marinhos como sardinha, salmão, atum, anchova, arenque, etc

Ácido linolênico	Estimula o sistema imunológico e tem ação anti-inflamatória	Óleos de linhaça, colza, soja, nozes e amêndoas
Catequinas	Reduzem a incidência de certos tipos de câncer, reduzem o colesterol e estimulam o sistema imunológico	Chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa, vinho tinto
Licopeno	Antioxidante, reduz níveis de colesterol e o risco de certos tipos de câncer como o de próstata	Tomate e derivados, goiaba vermelha, pimentão vermelho, melancia
Luteína e Zeaxantina	Antioxidante; protegem contra degeneração macular	Folhas verdes (luteína) pequi e milho (zeaxantina)
Indóis e Isotiocianatos	Indutores de enzimas protetoras contra o câncer, principalmente de mama	Couve flor, repolho, brócolis, couve de Bruxelas, rabanete, mostarda.
Flavonóides	Atividade anti-câncer, vasodilatadora, anti-inflamatória e antioxidante	Soja, frutas cítricas, tomate, pimentão, alcachofra, cereja, salsa, etc
Fibras solúveis e insolúveis	Reduz risco de câncer de cólon, melhora o funcionamento intestinal. As solúveis podem ajudar no controle da glicemia e no tratamento da obesidade, pois dão maior saciedade	Cereais integrais como aveia, centeio, cevada, farelo de trigo, etc, leguminosas como soja, feijão, ervilha, etc, hortaliças com talos e frutas com casca
Prebióticos-frutooligosacarídeos, inulina	Ativam a microflora intestinal, favorecendo o bom funcionamento do intestino	Extraídos de vegetais como raiz de chicória e batata yacon
Sulfetos alílicos (alil sulfetos)	Reduzem colesterol, pressão sanguínea, melhoram o sistema imunológico e reduzem risco de câncer gástrico	Alho e cebola
Lignana	Inibição de tumores hormônio-dependentes	Linhaça, noz moscada
Tanino	Antioxidante, anti-séptico, vasoconstrutor	Maçã, sorgo, manjeriço, manjerona, sálvia, uva, caju, soja, etc

Estanois e esteróis vegetais	Reduzem risco de doenças cardiovasculares	Extraídos de óleos vegetais como soja e de madeira
Probióticos-Bifidobactérias e Lactobacilos	Favorecem as funções gastrointestinais, reduzindo o risco de constipação e câncer de cólon	Leites fermentados, iogurtes e outros produtos lácteos fermentados
Limonóides	Frutas cítricas	Estimulo à produção de enzimas protetoras contra o câncer e redução do colesterol

Quadro 1. Principais compostos funcionais investigados pela ciência.
Fonte: Adaptado de Cardoso e Oliveira, 2008

3.4 PROBIÓTICOS

De acordo com *Food and Agriculture Organization of United Nations, World Health Organization (FAO/WHO)*, probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Para ser aplicado como probiótico, o microrganismo precisa ser *Generally Recognized as Safe (GRAS)*, ou seja, seguro para ser usado para consumo humano, ter identificação internacionalmente conhecida (espécie e subespécie da cepa); resistir à acidez gástrica e à ação dos sais biliares; possuir efeitos benéficos ao hospedeiro demonstrados *in vivo* e *in vitro* por meio de uma dose conhecida; ter capacidade de adesão ao muco ou epitélio intestinal; apresentar segurança comprovada (baixo risco de infecção sistêmica e de produção de toxinas deletérias, não oferecer estímulo excessivo à resposta imunológica e não possibilitar a transferência de genes entre microrganismos) e possuir a garantia da manutenção da viabilidade até o momento do consumo na forma de cápsula, pó ou quando adicionada a produtos lácteos (SOUZA, *et al.*, 2010).

Os probióticos mais utilizados no desenvolvimento de alimentos são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium (B.)*: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L.*

gallinarum, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (KOPPER, 2009).

As bactérias probióticas liberadas pela ANVISA são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

Bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) são de uma classe funcional de bactérias fermentadoras não patogênicas, não toxigênicas, úteis para a fermentação de alimentos. Neste grupo estão incluídas as espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus thermophilus*. As BAL são as mais utilizadas em produtos probióticos, mas nem todos probióticos são BAL (*World Gastroenterology Organization* (WGO), 2008).

Os microrganismos probióticos devem ser veiculados em produtos selecionados que sejam de fácil aceitação pelo consumidor, nos quais a célula seja mantida na sua forma viável. Leites e derivados, por ocuparem grande parte do mercado brasileiro, oferecem muitas possibilidades para serem utilizados como adjunto dietético (BADARÓ, *et al.*, 2009).

O uso mais comum de microrganismos probióticos tem sido em produtos lácteos, como leites fermentados, sorvetes, queijos e sobremesas lácteas. E sua viabilidade neste tipo de produto pode ser afetada por vários fatores como a produção de ácido láctico e peróxido de hidrogênio por fermentos tradicionais, presença de oxigênio, assim como interações entre cepas presentes e a concentração de açúcar (BADARÓ *et al.*, 2008).

Para aplicação de microrganismos probióticos com concentrações apropriadas de células viáveis durante a sua vida-de-prateleira, os produtos lácteos fermentados são os alimentos mais comumente utilizados (CORRÊA, 2006).

O quadro 2 apresenta as cepas de probióticos, a marca e os produtos onde são aplicadas.

Cepa (identificações alternativas)	Nome da Marca	Fabricante
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon

<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter e Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCMF		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 229V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730	Retueri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit e outros	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) Iyo	DiarSafe, Ultralevure e outros	Wren Laboratories Biocodex, y otros
<i>Analisados como culturas associadas</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 e <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 e <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
VSL#3 (mistura de uma cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , quatro <i>Lactobacillus spp</i> e três cepas de	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.

<i>Bifidobacterium spp</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 e <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica e outros	Institut Rosell
<i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN, e T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

Quadro 2. Exemplos de cepas de probióticos em produtos

Fonte: WGO, 2008.

Segundo Corrêa (2006), diversos autores vêm sugerindo possíveis efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro, tais como: modulação da microbiota intestinal e promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; auxílio para recompor a microbiota intestinal após uso de antibióticos; promoção à digestão da lactose em indivíduos intolerantes; estimulação do sistema imune, sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. A resposta imune pode ser aumentada quando um ou mais probióticos são consumidos concomitantemente. Embora ainda não comprovados, outros efeitos são atribuídos a essas culturas como a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. É sugerida, também, uma diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade.

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (REZENDE, 2008).

Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunitários e os não-imunitários da mucosa através de um antagonismo/concorrência com os patogênicos potenciais. Pensa-se que estes fenômenos mediam a maioria dos efeitos benéficos, inclusive a redução da incidência e gravidade da diarreia, que

é um dos usos mais amplamente reconhecidos dos probióticos. Reduzem o risco de câncer de cólon em modelos animais, provavelmente porque suprimem a atividade de certas enzimas bacterianas que podem aumentar os níveis de pró-carcinógenos (WGO, 2008).

No Brasil, a ANVISA através da Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos estabeleceu, por meio de uma lista de alegações de propriedades funcionais, que a quantidade mínima diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos terapêuticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante. De acordo com Resolução RDC nº 359 de 23 de dezembro de 2003 que aprova o Regulamento Técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional da ANVISA, estabelece para sobremesas lácteas a porção diária para consumo a quantidade de 120 gramas (BRASIL, 2003).

3.5 LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

O gênero *Lactobacillus* (*L.*) foi isolado pela primeira vez de fezes de lactentes amamentados com leite materno, sendo atribuído o nome de *Bacillus acidophilus*. Estes microrganismos são classificados como gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, são aerotolerantes ou anaeróbios. O gênero compreende naturalmente cinquenta e seis espécies oficialmente reconhecidas (RIBEIRO, 2008). Os *Lactobacillus* são microaerófilos, quando cultivados em meio sólido, o seu desenvolvimento é melhor em anaerobiose (BADARÓ *et al*, 2008).

Contém um grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, capazes de crescerem em temperaturas que variam de 2-53°C, embora o crescimento ótimo seja em torno de 35-40°C. Possui uma tolerância a pHs ácidos, porém o pH ótimo para seu desenvolvimento está entre 5,5 e 6,0. Desses microrganismos, o *L. acidophilus* é o mais utilizado e estudado como probiótico nos últimos anos (RODRIGUES, 2012).

O *L. acidophilus* tem sido avaliado em vários estudos com seres humanos, entre alguns benefícios estão, a melhora a digestão da lactose, a redução dos níveis de enzima intestinal associada ao câncer, à diminuição dos níveis de aminas tóxicas do sangue geradas a partir de super crescimento bacteriano no intestino delgado, e a sobrevivência ao trânsito gástrico (PROBIOTICO...,2004). Existem relatos na literatura demonstrando que o consumo de produtos contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum* pode reduzir o colesterol sérico em humanos e animais (MOROTI *et. al*, 2009).

O *L. acidophilus* é considerado um microrganismo probiótico em razão dos benefícios relacionados ao consumo, sendo muito utilizado na indústria de laticínios, na fabricação de diversos produtos (ALVES *et al.*, 2011). Produtos como queijo, sorvetes, *frozen yogurt* e sobremesas lácteas, se apresentam como bons veículos para a incorporação do *Lactobacillus acidophilus*, atingindo populações entre 10^6 e 10^8 UFC/g ou mL (SOUZA, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Como cultura probiótica, foi utilizada a cepa *Lactobacillus acidophilus* La-5, doada pela empresa Christian-Hansen (Valinhos – SP).

A matéria prima empregada no desenvolvimento da sobremesa láctea cremosa foi adquirida no comércio local de Ponta Grossa – PR.

O concentrado protéico de soro foi doado pela empresa Alibra Ingredientes Ltda. (Campinas-SP) e as gomas carragena e guar foram doadas pela empresa Fermentech Comércio de Insumos para Alimentos Ltda. (São Paulo-SP).

Os reagentes, meios de cultura assim como outros insumos utilizados no desenvolvimento do trabalho eram de padrão analítico ou microbiológico.

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados serão divididos em obtenção da sobremesa láctea cremosa e avaliação da estabilidade durante armazenamento.

4.2.1 Recuperação e preparo da cultura láctica

A cepa do *Lactobacillus acidophilus* La-5 armazenada sob congelamento a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ foi submetida inicialmente a três repiques consecutivos em meio leite desnatado (La Serenissima) reconstituído (LDR) a 10% a 37°C por 24 horas. Após o terceiro repique, foi transferido parte do material para os tubos contendo caldo MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) (Himedia) e incubados a 37°C por 24 horas.

A cultura láctica, utilizada diretamente na formulação da sobremesa, foi preparada com LDR a 10% adicionado de 1% de glicose (Merck) e 10% de caldo MRS contendo a cepa ativa, sendo incubada a 37°C durante 24 horas e posteriormente foi feito o plaqueamento por *drop plate*.

4.2.2 Obtenção da sobremesa láctea cremosa

A formulação da sobremesa está apresentada na Tabela 1, na sequência está descrito o método de obtenção empregado.

Tabela 1. Lista de ingredientes utilizados na obtenção da sobremesa.

Ingredientes	Marca	Proporção (%)
Leite fluido Integral	Tirol	71,00
Leite em pó desnatado	Sancor	6,30
Creme de leite (17%)	Batavo	3,60
Concentrado proteico de soro (80%)	Alibra	1,00
Sacarose	União	11,50
Chocolate em pó	Nestle	2,80
Goma carragena*	Danisco	0,05
Goma guar*	Danisco	0,25
	Christian	
Cultura láctica	Hansen	4,00
Sorbato de potássio	Biotec	0,08

***GRINDSTED® Carrageenan CL 350 H e GUAR 250.**

A sobremesa láctea cremosa desenvolvida foi adaptada da metodologia proposta por (NIKAEDO; AMARAL; PENNA, 2004).

Todos os ingredientes sólidos foram pesados e dissolvidos no leite fluido, exceto o sorbato de potássio. A mistura foi submetida à homogeneização em agitador tipo *Mixer* (Walitta) durante 5 minutos e levada ao aquecimento por 15 minutos a 75°C para a completa hidratação das gomas. Em seguida a sobremesa foi resfriada a 40°C e na sequência foram adicionados o inóculo e o sorbato de potássio. A sobremesa foi distribuída em embalagens plásticas de polipropileno (PP) e resfriada a 4°C±2°C.

4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA SOBREMESA DURANTE ARMAZENAMENTO

A estabilidade do *Lactobacillus acidophilus* foi determinada nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 do armazenamento refrigerado (4°C±2°C), utilizando métodos para contagem e análises de oxigênio dissolvido, acidez total titulável, calorimetria e pH.

4.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Para determinação da população celular, foi utilizada a metodologia de plaqueamento por *drop plate*, proposta por Silva *et al.* (2010), que consiste na deposição em quadrantes em triplicata, de gotas de 10 µL da diluição de interesse na superfície do ágar. A população celular foi estabelecida de acordo com a Equação 1.0, a seguir.

$$PC = NC \times 100 / D \quad \text{Eq. 1.0}$$

Onde,

PC – população celular obtida (UFC/g ou UFC/mL);

NC – número de colônias contadas;

D – diluição em que foi realizada a contagem das colônias;

4.3.2 Resistência *in vitro* do *Lactobacillus acidophilus* ao sistema gastrointestinal (SGI)

O protocolo utilizado foi adaptado das metodologias propostas por Fernández, Boris e Barbés (2003) e Buriti, Castro e Saad (2010).

Consiste na simulação do SGI durante seis horas sob agitação e aquecimento, nas condições em que o alimento é submetido à digestão. Sendo a composição do suco gástrico (SG) e o (SI) descritos nos Quadros 3 e 4.

Composição Suco Gástrico		
Componentes	Marca	Concentração
Cloreto de sódio	(Biotec)	125 mmolar
Cloreto de potássio	(Biotec)	7 mmolar
Bicarbonato de sódio	(CRQ)	45 mmolar
Pepsina porcina	(Nuclear)	3g/L

Quadro 3. Lista de componentes utilizados na obtenção do suco gástrico
Fonte: Autoria própria

O suco gástrico foi corrigido com ácido clorídrico em pH 2,0 e 4,0 e esterilizado com filtro a 0,22 µm (Sartorius Stedim).

Composição Suco Gástrico		
Componentes	Marca	Concentração
Cloreto de sódio	Biotec	5g/L
Pancreatina porcina	Merck	1g/L (350 FIP-U/g de protease; 6000 FIP-U/g de lípase; 7500 FIP-U/g de amilase)
Bile bovina	Himedia	1,5 g/L

Quadro 4. Lista de componentes utilizados na obtenção do suco intestinal
Fonte: Autoria própria

O suco intestinal foi corrigido com hidróxido de sódio em pH 8,0 e esterilizado com filtro a 0,22 μm .

A avaliação da resistência do *L. acidophilus* La-5 ao SGI foi realizada nas condições de pH 2,0 e pH 4,0 nos intervalos de tempo:

- T1 – 1 hora e 30 minutos;
- T2 – 3 horas;
- T3 – 4 horas e 30 minutos;
- T4 – 6 horas;

Sendo que os tempos T1 e T2 são realizados em presença de suco gástrico, enquanto que os tempos T3 e T4 são em presença de suco intestinal.

A Figura 1 mostra as etapas do experimento e em seguida sua descrição.

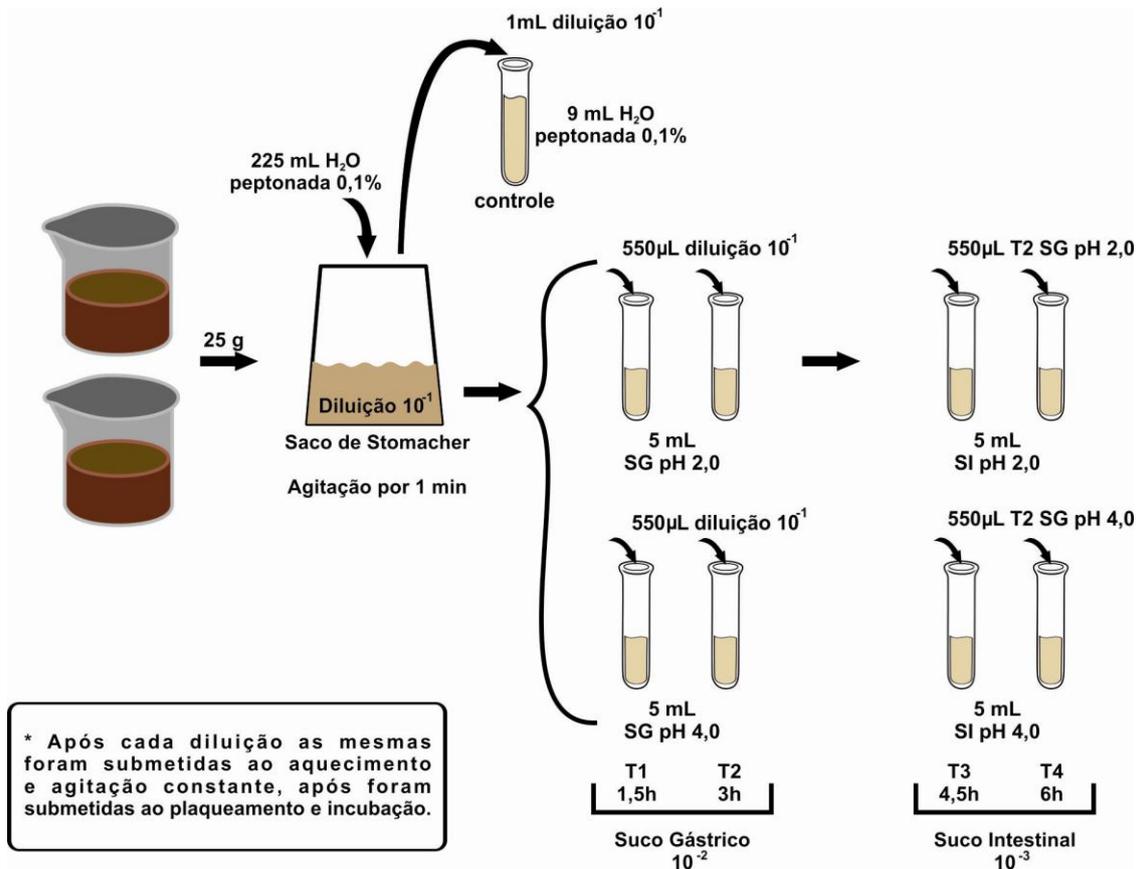


Figura 1. Simulação da resistência *in vitro* do *Lactobacillus acidophilus* ao sistema gastrointestinal durante seis horas sob agitação e aquecimento

Foram pesados 25g da amostra em sacos estéreis, com 225 mL de água peptonada a 0,1% e submetidos à homogeneização em homogeneizador de Stomacher (Marconi, MA440). Na sequência, foi realizada uma diluição seriada em água peptonada a 0,1% para controle de comparação do crescimento das bactérias (T_C), ainda da diluição 10⁻¹ foram coletadas quatro alíquotas de 550µL que foram adicionadas em tubos contendo 5 mL de SG em pH 2,0 e 5 mL de SG em pH 4,0, sendo identificadas como T1 e T2 . Os quatro tubos de ensaio foram incubados a 37°C em sistema de agitação orbital (Tecnal ,TE-420) a 150 rpm, após 1 hora e 30 minutos e 3 horas de incubação, os tubos denominados de T1 e T2, respectivamente foram retirados e submetidos à diluição seriada em água peptonada a 0,1% e plaqueados em ágar MRS (Acumedia) pelo método *drop plate*, em seguida incubados em aerobiose a 37°C por 72 horas.

Para os tubos de ensaio do T2 também foram coletadas, após agitação vigorosa, duas alíquotas de 550 µL do SG em pH 2,0 e outros dois volumes de 550 µL do SG em pH 4,0 e adicionadas em quatro tubos de ensaio contendo 5 mL de SI,

que foram denominados de T3 e T4. Imediatamente os quatro tubos contendo o suco intestinal foram levados para a incubadora a 37°C e 150 rpm, os tubos T3 e T4 permaneceram por mais 1 hora e 30 minutos e 3 horas de incubação, respectivamente. Desta forma, o SI do T3 totalizou 4 horas e 30 minutos de ensaio e o SI dos tubos T4 finalizou a avaliação com 6 horas. Os sucos intestinais dos tempos T3 e T4 foram submetidos à diluição e plaqueamento como descritos anteriormente.

Os resultados para a avaliação da resistência da cepa lática ao SGI foram expressos na forma de índice de sobrevivência (IS), conforme descrito na Equação 2.0.

$$IS = \log UFC/gT / \log UFC/gTc \times 100 \quad \text{Eq. 2.0}$$

Onde,

IS – índice de sobrevivência (%);

T – tratamento em que as células foram submetidas;

T_C – tratamento controle;

4.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

A estabilidade da sobremesa láctea cremosa durante o período de armazenamento refrigerado foi determinada por medidas instrumentais e físico-químicas, sendo elas:

O teor de oxigênio dissolvido nas amostras foi avaliado em equipamento portátil (ICEL/OD4000), sendo padronizado o tempo de 10 minutos para permanência do eletrodo inserido na amostra. Os resultados foram expressos em mg/L⁻¹

O potencial hidrogeniônico foi medido com peagâmetro digital de bancada (Tecnal, Pec-2MP) padronizado com soluções padrão de pH 4 e pH 7, diretamente na sobremesa.

A determinação da acidez total titulável foi realizada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os resultados foram expressos em gramas de ácido láctico por 100 g de sobremesa.

A atividade de água foi determinada com higrômetro AQUA Lab (série 3TE) com sensor de infravermelho, com precisão de $\pm 0,003$, em temperatura ambiente de $20^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Para medida da cor utilizou-se Colorímetro (Chroma Minolta Meter, CR 410) de acordo com a escala $L^* a^* b^*$ ou CIELab, recomendada pela *Commision Internationale de L'Eclairage* (CIE). A interpretação ocorreu por meio das equações 3.0 e 4.0

$$C = (a^*)^2 + (b^*)^2 \quad \text{Eq. 3.0}$$

Onde,

C^* = *Chroma* – obtém-se a cor real do objeto analisado;

a^* = coloração na região do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$);

b^* = indica coloração no intervalo do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$);

$$H^0 = \arctg b^*/a^* \quad \text{Eq. 4.0}$$

Onde,

H^0 = *Hue-Angle* – ângulo formado entre a^* e b^* indicando a saturação da cor do objeto.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tratados estatisticamente utilizando os programas SASM-Agri versão 8.2 de acordo com Canteri *et al.* (2001) e Microsoft Excel versão 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RECUPERAÇÃO DA CULTURA LÁTICA

A cultura lática que foi adicionada na sobremesa obteve população celular de $1,1 \times 10^{12}$ log UFC/mL.

5.2 OBTENÇÃO DA SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA

Para a realização do experimento, foi utilizada uma formulação para 4 Kg de sobremesa, posteriormente foi distribuída em embalagens plásticas de polipropileno (PP), com volume aproximado de 80 g e armazenada em refrigerador a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO *L. ACIDOPHILUS* NOS DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO.

Os valores médios de log UFC de *L. acidophilus* La-5 por 120g de sobremesa láctea cremosa, durante o período de armazenamento, está apresentado no Gráfico 1.

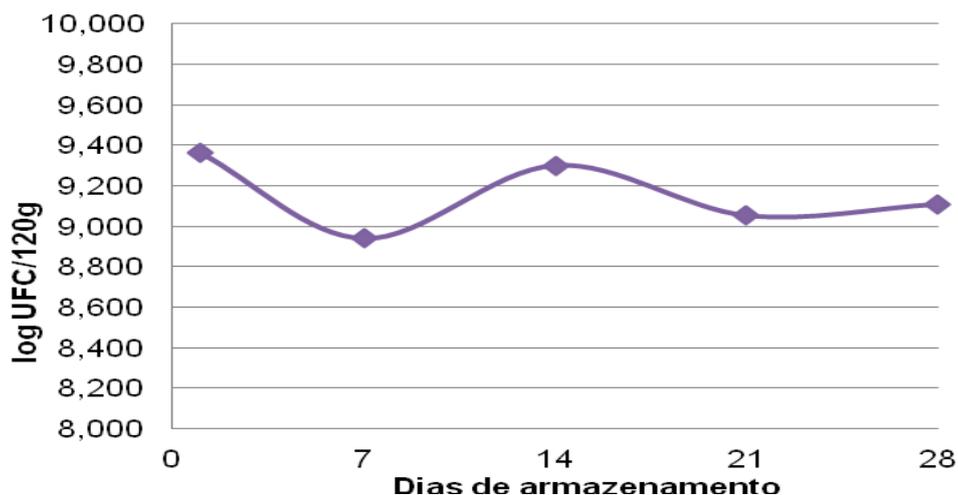


Gráfico 1. Viabilidade de *L. acidophilus* La-5 em sobremesa láctea cremosa durante período de armazenamento

A contagem média do número de células viáveis do microrganismo probiótico *L. acidophilus* permaneceu entre 9,362 e 8,940 log de UFC/120g ($2,0 \times 10^9$ a $2,2 \times 10^8$ UFC/120g). Os valores encontrados para a contagem de bactérias probióticas estão de acordo com os valores estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, onde determina que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC), em uma porção diária de consumo de 120g de sobremesa.

Mundim (2008) encontrou resultados semelhantes para o iogurte com leite de cabra saborizado com frutos do cerrado e suplementado com inulina, onde a contagem do número de células viáveis do *L. acidophilus* permaneceu entre $1,05 \times 10^9$ a $7,09 \times 10^8$ UFC/mL para o iogurte sabor araticum, $1,10 \times 10^9$ a $1,38 \times 10^8$ UFC/mL para o iogurte sabor cagaita e $1,30 \times 10^9$ a $7,20 \times 10^8$ UFC/mL para o iogurte sabor pequi, com redução máxima de um ciclo logarítmico para as amostras dos iogurtes funcionais após 28 dias de estocagem.

Amaral *et al.* (2010) avaliaram a viabilidade de probióticos em queijo de cabra tipo *Boursin*. As contagens médias da população de *L. acidophilus* obtidas durante o período de 28 dias, foram de aproximadamente 7,74 e 6,97 logUFC/g⁻¹ nas duas primeiras semanas de estocagem refrigerada. Todavia, com o início da terceira e da quarta semana a população foi reduzida para 5,39 e 5,33 logUFC/g⁻¹, respectivamente, cuja diferença foi significativa em relação às duas primeiras semanas.

Buriti e Saad, 2009 avaliaram a resistência do probiótico *L. acidophilus in vitro* em sobremesa láctea aerada simbiótica sob refrigeração (4°C), durante 28 dias e sob congelamento (-18°C), durante 112 dias. As maiores populações de *L. acidophilus*, foram alcançadas nas musses congeladas com valores superiores a 7 log UFC/g⁻¹ por até 12 semanas de armazenamento. A viabilidade da cepa se mostrou satisfatória durante os 28 dias nas musses refrigeradas com populações entre 7,7 e 6,2 log UFC/g⁻¹.

5.4 RESISTÊNCIA DO *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS IN VITRO* AO SISTEMA GASTROINTESTINAL

A sobrevivência e a colonização no trato digestivo são consideradas aspectos críticos para o aumento da funcionalidade e a expressão de funções fisiológicas de

promoção à saúde por microrganismos probióticos (MEIRA *et al.*, 2010). Para sobreviver no intestino, os microrganismos devem ser tolerantes ao baixo pH do estômago, que geralmente varia de 2,5 a 3,5, que pode chegar a 1,5 durante o jejum e a 4,5 após a refeição. A natureza do alimento afeta o tempo de trânsito através do estômago, mas normalmente o alimento permanece de 2 a 4 horas (HUANG; ADAMS, 2004).

O Gráfico 2 apresenta o índice de sobrevivência do *L. acidophilus* La-5 na sobremesa submetido ao sistema gastrointestinal em pH 2,0, a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ nos diferentes tempos de armazenamento.

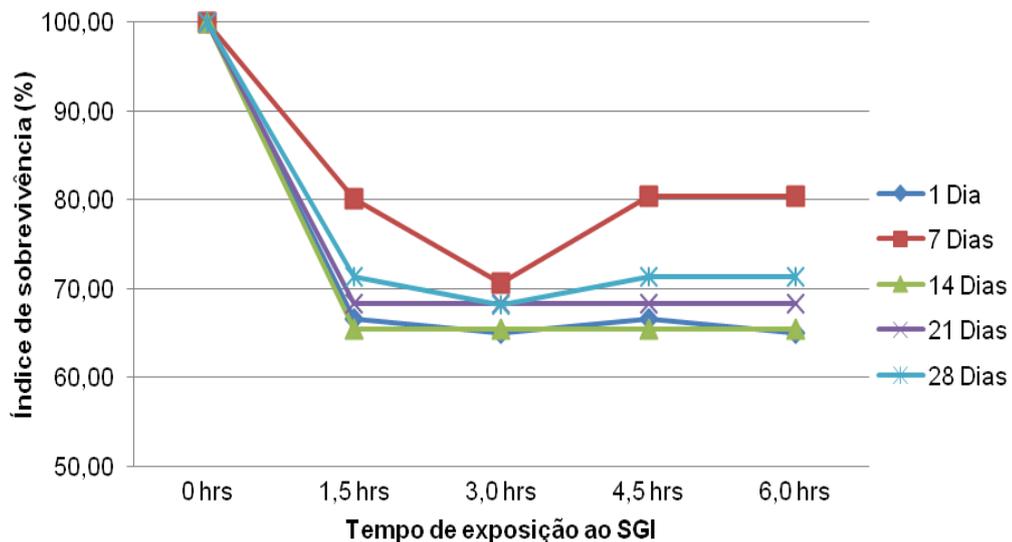


Gráfico 2. Índice de sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 frente ao SGI em pH 2,0.

O Gráfico 2 demonstra que, exceto para a curva de 7 dias, o índice de sobrevivência médio ao SGI foi de 70%. Portanto houve uma perda de 30% da população presente na sobremesa, durante a passagem do alimento no sistema gastrointestinal em pH 2,0.

Quando um microrganismo é exposto a um estresse prévio, como a exposição a condições desfavoráveis de temperatura e pH, as células sobreviventes podem apresentar melhor tolerância à ambientes desfavoráveis posteriormente, como é o caso das condições adversas do trato gastrointestinal (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010).

O Gráfico 3 apresenta o índice de sobrevivência do *L. acidophilus* na sobremesa durante 6 horas de exposição em pH 4,0 para os diferentes tempos de estocagem da sobremesa sob refrigeração.

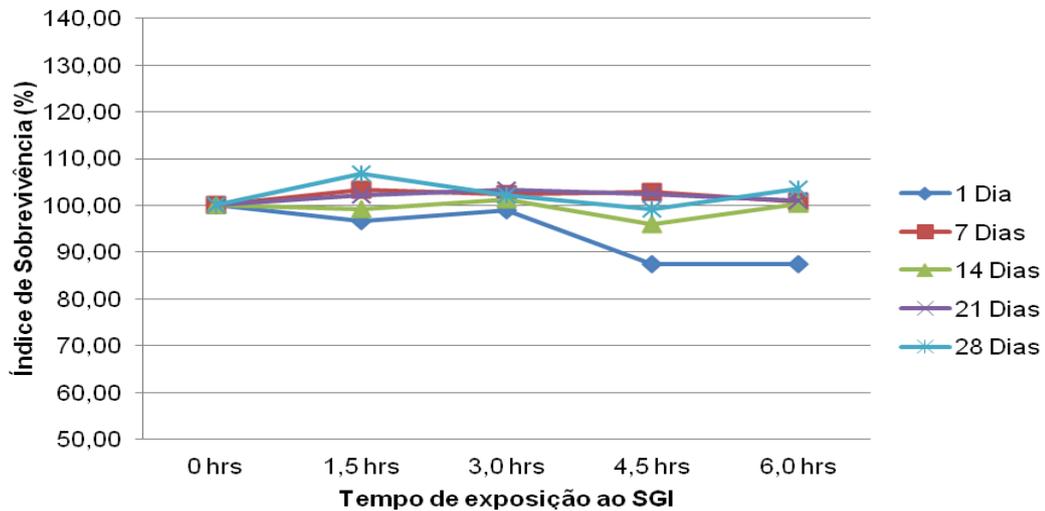


Gráfico 3. Índice de sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 frente ao SGI em pH 4,0.

O Gráfico 3, mostra que os índices de sobrevivência do *L. acidophilus* foram de aproximadamente 90%, ou seja, uma perda de apenas 10% da população inicial presente na matriz alimentar.

Guo *et al.* (2009) observaram que ao submeter as cepas *Lactobacillus* (*L.*) *casei* Zhang, *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* GG e *Bifidobacterium animalis* Bb12 em contato com suco gástrico simulado em pH 2,5, 3,0 e 4,0, a presença da pepsina melhorou a sobrevivência dos probióticos nas condições ácidas testadas. Mattö *et al.* (2006) observaram que a suplementação com pepsina melhorou a sobrevivência da cepa *B. animalis* subsp. *lactis* durante a exposição a baixo pH.

A habilidade dos microrganismos probióticos em sobreviver às condições gástricas e entéricas, e depois colonizar o trato gastrointestinal, é considerada um biomarcador essencial para garantir os benefícios potenciais atribuídos ao consumo de produtos probióticos (FRIGHETTO, 2012).

Frighetto (2012) demonstrou em condições gastrointestinais simuladas em sorvete, que as contagens de *L. paracasei* Lpc-37 apresentaram redução de cerca de 4 log UFC/g⁻¹ após 30 minutos e 4 horas de exposição à níveis de pH 1,4 e 1,9 respectivamente, e que parte destes microrganismos foi recuperado quando o pH aumentou para 6,7-7,5, decorridas 6 horas de ensaio.

A Tabela 2 apresenta a média do índice de sobrevivência do *L. acidophilus* em SGI pH 2,0 e pH 4,0 ao longo do período de armazenamento em temperatura de $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ na sobremesa láctea cremosa.

Tabela 2. Índice de sobrevivência do *L. acidophilus* em pH 2,0 e pH 4,0 armazenado a $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o período de 28 dias

Tempo (dias)	SGI em pH 2,0	SGI em pH 4,0
1	65,782 \pm 0,98 ^{c*}	92,617 \pm 6,06 ^b
7	77,854 \pm 4,82 ^a	102,383 \pm 1,15 ^a
14	65,380 \pm 1,12 ^c	99,245 \pm 2,29 ^a
21	68,257 \pm 1,95 ^{bc}	102,299 \pm 0,97 ^a
28	74,742 \pm 4,74 ^{ab}	102,956 \pm 3,11 ^a

*** Nota-** São apresentados os valores médios das triplicatas e os respectivos desvios padrão, médias seguidas de letras diferentes nas colunas apresentam diferença significativa á 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Após exposição ao SGI em pH 2,0, o *L. acidophilus* apresentou média de sobrevivência entre 65,38 e 77,85% durante os 28 dias de armazenamento. Nas condições ao SGI pH 4,0, o índice de sobrevivência das bactérias foi maior se comparado com o pH 2,0, apresentando média entre 92,62 e 102,96% de crescimento durante o período de armazenamento. Os tempos 1, 14 e 21 não apresentaram diferença significativa entre si, porém apresentaram diferença significativa dos tempos 7 e 28 a nível de 5%, confirmado pelo teste de Tukey com relação ao pH 2,0. Em relação ao pH 4,0, apenas o tempo 1 apresentou diferença significativa a nível de 5% dos demais tempos, confirmado pelo teste de Tukey.

De acordo com Brinques e Ayub (2009), quando exposto ao suco intestinal simulado, o *L. plantarum* na forma livre apresentou ligeira diminuição de 2 e 4 ciclos logarítmicos em relação ao controle. Na forma imobilizada em esferas elaboradas com alginato de sódio a 3% e 2% e pectina cítrica a 2%, não apresentou diminuição na viabilidade dos microrganismos em relação ao controle. Na exposição do *L. plantarum* ao suco gástrico houve uma drástica diminuição do número total de sobreviventes sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos de imobilização.

Araújo *et al.* (2009), relata em seu estudo de quantificação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em queijo tipo *Cottage* simbiótico, que houve diferença significativa na sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20, quando exposto aos valores de pH (7,0;

3,5; e 2,5), e a exposição ao estresse (60, 120, 180 e 240 minutos). Sendo que para o pH 2,5, o tempo de exposição acarretou maior redução no número de bactérias probióticas, pois, à medida que se aumentava o tempo de exposição à condição ácida, menor era o número de células sobreviventes a esse estresse, provocando uma redução de viabilidade de 4 ciclos logarítmicos.

5.5 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA SOBREMESA LÁCTEA CREMOSA DURANTE O ARMAZENAMENTO

As análises físico-químicas realizadas na sobremesa durante o período de armazenamento estão apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3. Resultados de oxigênio dissolvido, pH, acidez total titulável e atividade de água em sobremesa láctea cremosa durante o período de armazenamento

Tempo (dias)	Oxigênio Dissolvido (mg/L ⁻¹)	pH	Acidez Total (g / 100 g de ácido láctico)	Aa
1	6,89±2,2 ^{ab}	6,44 ± 0,04 ^a	0,47±0,01 ^a	0,98±0,001 ^{ab}
7	7,62±1,5 ^{ab}	6,49 ± 0,02 ^a	0,45±0,01 ^a	0,98 ± 0,006 ^a
14	5,73±0,7 ^{bc}	6,47±0,02 ^a	0,46± 0,03 ^a	0,97±0,001 ^b
21	8,45±1,1 ^a	6,33±0,02 ^b	0,46± 0,02 ^a	0,97±0,002 ^{ab}
28	3,91±0,6 ^c	6,47 ± 0,02 ^a	0,53± 0,07 ^a	0,97±0,002 ^{ab}

* Nota- Médias seguidas de letras diferentes nas colunas, apresentam diferença significativa á 5% de probabilidade pelo teste de Tukey - São apresentados os valores médios das triplicatas e o respectivo desvio padrão.

Para a análise de oxigênio dissolvido os tempos 1, 7 e 21 não apresentaram diferença significativa entre si e os tempos 14 e 28 não apresentaram diferença significativa entre si, confirmado pelo teste de Tukey a nível de 5%.

Devido à presença de gomas na formulação da sobremesa, pode ter havido incorporação de ar de modo heterogêneo e, como consequência, o teor de oxigênio dissolvido apresentou grande variação durante o período de armazenamento, não apresentando regularidade nos resultados.

Houve diferença significativa na variação do pH, somente no ponto 21 dias, isto pode ser decorrente da calibração do equipamento, já que para os demais pontos não houve diferença significativa.

Comparando os resultados de pH obtidos na avaliação na sobremesa láctea com os resultados de Maruyama *et al.*(2006), o *Lactobacillus acidophilus*

apresenta pH ótimo de multiplicação ao redor de 5,5 a 6,0 , sendo resistente ao armazenamento em baixas temperaturas. Mostra se que a sobremesa láctea cremosa permaneceu dentro da estimativa de pH ótimo de multiplicação .

As proteínas com atividade tamponante são comuns em leite e derivados, portanto as medidas de acidez e pH não são obrigatoriamente proporcionais. Por isto, no presente trabalho, no ponto em que o pH obteve diferença significativa a acidez total não apresentou o mesmo resultado.

A acidez total titulável não obteve diferença significativa durante os 28 dias de conservação, este resultado pode ser comparado com os resultados obtidos por Kopper (2009) que define que probióticos, como *Lactobacillus acidophilus*, além de trazer benefícios nutricionais a quem os consomem, promovem uma acidificação mais lenta após seu processamento, o que ajuda a manter a contagem das bactérias probióticas até o final do armazenamento.

Onde este resultado pode ser comparado com os resultados obtidos por Silva (2007) onde mostraram que em iogurtes armazenados sob refrigeração, a acidez pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial da mesma, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenagem e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas. Granato (2009) obteve resultados semelhantes para a acidez total titulável em emulsões tipo sobremesa à base de cacau e chocolate com adição de inulina e verificaram que os parâmetros de acidez titulável das amostras não variaram nos 28 dias de armazenamento refrigerado.

Para a atividade de água houve diferença significativa confirmada pelo teste de Tukey na sobremesa láctea cremosa refrigerada para os tempos 7 e 14 dias de 1,02%. Estes resultados obtidos no presente estudo são semelhantes ao de Buriti *et.al* (2005), onde desenvolveram dois tipos de queijo minas frescal incorporando *L. acidophilus* e verificaram que as amostras estudadas apresentaram um ligeiro decréscimo, não significativo, nos valores de atividade de água (Aa) durante o armazenamento.

Em um estudo realizado por Vieira (2011), onde também utilizou gomas na formulação de sobremesa láctea desenvolveu quatro formulações de sobremesa láctea simbiótica com diferentes combinações de gomas, verificou que a atividade de água nas sobremesas ao longo do tempo de estocagem (3,10,17, 30, 37 e 60 dias) os resultados mostraram que as concentrações de amido resistente, de goma

guar e de carragena não influenciaram significativamente nos valores de atividade de água.

Segundo Boscarioli (2010), que analisou a influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete, os valores médios de atividade de água das cápsulas produzidas de acordo com os tratamentos com alginato de cálcio, amido resistente e goma acácia e submetidas ao processo de secagem, não apresentaram diferença significativa, permanecendo em torno de 0,995. A Tabela 4 apresenta os resultados dos parâmetros de cor: luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) em sobremesa láctea cremosa.

Tabela 4. Parâmetros de cor: luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) em sobremesa láctea cremosa.

Tempo (dias)	L^*	Chroma	Hue-Angle (H°)
1	42,60±0,600 ^{b*}	14,45±0,394 ^{ab}	60,25±0,675 ^b
7	42,09±0,760 ^b	14,70±0,233 ^a	59,48±0,116 ^b
14	44,59±0,098 ^a	14,23±0,124 ^{ab}	59,64±0,185 ^b
21	42,00±0,061 ^b	14,83±0,074 ^a	71,47±0,214 ^a
28	45,25±0,088 ^a	13,87±0,013 ^b	59,37±0,114 ^b

*Letras diferentes nas colunas, apresentam diferença significativa a 5% (Tukey)

A variação no eixo L^* representa mudanças na luminosidade, com uma faixa de ($L^* = 0$ correspondendo ao preto e $L^* = 100$ correspondendo ao branco) e a^* e b^* são as coordenadas de cores responsáveis pela cromaticidade, onde o Chroma representa o índice de saturação e o *Hue-Angle* é responsável pela tonalidade cromática.

De acordo com a Tabela 4, o parâmetro L^* que representa a luminosidade da cor, não apresentou diferença significativa para os dias 1, 7 e 21, os dias 14 e 28 também não apresentam diferença significativa entre si, porém, os dias 14 e 28 apresentaram diferença significativa entre os demais dias.

Para o parâmetro *Chroma*, que representa a pureza ou intensidade da cor, não houve variação significativa durante 21 dias de conservação, porém com 28 dias o resultado médio obtido foi estatisticamente semelhante aos 14 dias assim como com um dia de armazenamento.

O parâmetro *Hue-angle* que indica a saturação da cor apresentou diferença significativa de 18,63% apenas com 21 dias de armazenamento, confirmada pelo teste de Tukey.

Em um estudo desenvolvido por Vidigal (2009), de sobremesa láctea *diet* contendo concentrado proteico de soro com diferentes concentrações de CPS (1,5, 3,0 e 4,5%), semelhante ao presente trabalho desenvolvido, verificou-se que o aumento da concentração de CPS tende a aumentar os valores de Chroma, e reduzir os valores de luminosidade e *Hue-Angle*. Oliveira *et al.* (2003), realizaram um trabalho de medida instrumental de cor em sobremesas lácteas comerciais de chocolate disponíveis no mercado: flans (2 amostras), pudins (3 amostras) e pudins dietéticos (5 amostras). Os produtos estudados tinham em comum, na formulação, amido, cacau, sal e aromatizantes. Na análise de *flans* o parâmetro luminosidade apresentou diferença significativa entre as amostras, comparados com os resultados obtidos no presente trabalho, para Chroma e *Hue-Angle* as amostras não apresentaram diferença significativa. Na análise dos pudins convencionais no parâmetro luminosidade as três amostras apresentaram diferença significativa e para Chroma e *Hue-Angle* foram obtidos resultados semelhantes com o presente trabalho onde apenas uma amostra apresentou diferença significativa. Nos pudins dietéticos para o parâmetro luminosidade duas amostras apenas não apresentaram diferença significativa, resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

A sobremesa láctea cremosa desenvolvida se mostrou um produto viável, pois a população de *L. acidophilus* atingiu valores acima de 10^8 UFC/g durante os 28 dias de armazenamento, sendo considerado um produto probiótico de acordo com a legislação brasileira vigente.

A cepa LA-5 utilizada foi resistente à simulação do sistema gastrointestinal, apresentando índice de sobrevivência superior em pH 4,0.

Quanto à estabilidade físico-química da sobremesa durante os 28 dias de conservação, para todos os parâmetros analisados somente a acidez total titulável não apresentou variação significativa.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. C. C.; GEMAL, N. D. H.; CORTEZ, M. A. S; FRANCO, R. M; MANO, S. B; 2011. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo minas frescal. **Arquivo brasileiro de medicina e veterinária**. v.63, n.6, p.1554-1566, 2011.

AMARAL, M. N. A.; LISERRE, A. M.; MONTEIRO, L. R.; BURITI, F. C. A.; GONÇALVES, L. N.; ZACARCHENCO, P. B.; MORENO, I.; SANTOS, K. M. O. Avaliação da viabilidade de probióticos em queijo de cabra tipo boursin. In: 4^o CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2010. Campinas. **Anais....**São Paulo.

ARAÚJO, E. A.; CARVALHO, A. F.; LEANDRO, E. S.; FURTADO, M. M.; MORAES C. A. Produção de queijo tipo *cottage* simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**. v.39, n. 2, p. 111-118, 2009

AS DIFERENÇAS..., 2011. **As diferenças entre produtos lácteos**. Disponível em: <<http://www.proteste.org.br>>. Acesso em: 26 mar. 2012

AUGUSTO, T. **Alimentos funcionais**. 2010. Disponível em: <saude.culturamix.com>. Acesso em: 23 maio 2012

BOSCARIOLI, M. P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete**. 73 fls. Dissertação (Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, São Paulo, 2010.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A. C. V. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana–parte 1. **Revista Digital de Nutrição**.v.2, p.1-21, 2008.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V. Alimentos probióticos : aplicações como promotores da saúde humana– parte 2. **Revista Digital de Nutrição**. v.3, p.1-29, 2009.

BOURROUL, G. Quando o leite respeita a natureza. **Revista Leite e Derivados**. v.17, n. 108, p. 64, 2008.

BRASIL. Resolução nº18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 maio, 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm> Acesso em: 24 mar. 2012

BRASIL. Resolução nº 2, de 22 de maio de 2000. Padrão de Identidade Qualidade do Leite e de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 maio, 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=15953>> Acesso em: 24 mar. 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 dezembro, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/rotuali.htm>> Acesso em: 24 mar. 2012.

BRANDÃO, S. C. C. Produtos lácteos probióticos, prebióticos, simbióticos e o mercado nacional e internacional. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS. 1., 2008, Campinas. **Anais....**Campinas, 2008.

BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Viabilidade de *Lactobacillus plantarum* imobilizados em diferentes condições em meios gastrointestinais simulados e sob condições de refrigeração. In: SEMINÁRIO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA. VIII-Oktoberforum, 2009. Porto Alegre. **Anais....**Rio Grande do Sul.

BURITI, F. C. A. **Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico in vitro**. 2009. 144 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

BURITI, F.C.A.; SAAD, S. M. I.. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, p.373-380, 2007.

BURITI, F.C.A., ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of lactobacillus acidophilus in minas fresh chesse and its implications for textual and sensorial properties during. **Storage Science Direct**.v.15,p.1279-1288, 2005.

CARDOSO, A. L.; OLIVEIRA, G. G. Alimentos Funcionais. **Jornal Eletrônico**. n. 5, 2008.

CLEMENTINO, I. M.; NASCIMENTO, J.; CORREIA, R. T. P. Sobremesa láctea aerada tipo mousse produzida a partir de leite caprino e frutas regionais. **Revista Pública** v.3, n.1, p.1-8, 2008.

CORRÊA, S. **Desenvolvimento de manjar branco potencialmente probiótico**. 2006. 92fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DANETTE..., 2011. Danette volta a investir em comunicação e aposta nas mídias sociais. **Revista Alimentos e Bebidas**. Disponível em: <<http://www.alimentosebebidas.com.br/noticias/2011/384/index.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2012.

FERNÁNDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**. v.94, p.449-455, 2003.

FRIGHETTO, J. M. **Produção de sorvetes com características simbióticas e avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* em condições gastrointestinais simuladas**. 2012. 71fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GRANATO, D. **Emulsão de soja e goiaba: caracterização físico-química, cromática, sensorial e de estabilidade**. 2009. 183fls. Dissertação de (Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **Food Science and Technology**, v.42, p.1640-1646, 2009.

HUANG, Y. ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potencia probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.253-260, 2004

JÚNIOR, J. **Mesmo com a alta nos preços dos produtos lácteos, consumo mantém patamar**. 2011. Disponível em: <<http://www.acesa.com>>. Acesso em: 24 de março de 2012.

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

KOPPER, A. C. **Bebida simbiótica elaborada com farinha de bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) e *Lactobacillus acidophilus*, incorporadas ao extrato hidrossolúvel de soja**. 2009. 79 fls. Dissertação de (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009

LAUSANNE, S. **Estudo Tetra Pak Dairy Index aponta que o aumento da urbanização e do poder de compra na Ásia, África e América Latina impulsionará o aumento da demanda por produtos lácteos**. 2011. Disponível em: <http://www.tetrapak.com/br/sobre_a_tetra_pak/imprensa/noticias_e_releases/Pages/TETRAPAKPREVÉCRESCIMENTODE30NOCONSUMODEPRODUTOSLÁCTEOSLÍQUIDOSATÉ2020.asp>. Acesso em: 28 mar. 2012

MARUYAMA., L. Y; CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo *petit suisse* potencialmente probiótico de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p.386-393, 2006

MATIAS, B. **Consumo de alimentos saudáveis no Brasil cresce 82%**. Agência Sebrae de notícias. 2010. Disponível em: <<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=199&cod=10042595&indice=0>> Acesso em: 22 maio 2012

MATTO, J.; ALAKOMI, H. L.; VAARI, A.; VIRKAJARVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Darry Journal**, v.16, p.1029-1037, 2006.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F. da C.; BRANDELLI, A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de

leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**, III SSA, p.75-80, 2010.

MERCER, E. N.; NASCIMENTO, G.; CORREIA, V. A.; SOARES Vera Ligia. Desenvolvimento e produção de um mousse de goiaba com posterior avaliação sensorial. In: VI SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS, 2008, Paraná. **Anais....Paraná**, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Departamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Resolução nº 2, de 22 de maio de 2000. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/56677884/44/Secao-II-Classificacao-de-Produtos-Lacteos>>. Acesso em: 22 mar. 2012

MOROTI, C.; MAGRI, L. F. S.; SOUZA, J. C. B.; MATOS, D. B. S.; COSTA, M. R.; SIVIERI, K. Potencial da Utilização de Alimentos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Redução de Colesterol Sanguíneo e Glicemia. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v.11, n.4, p.63-67, 2009.

MUNDIM, S. A. P. **Elaboração de iogurte funcional com leite de cabra, saborizado com frutos do cerrado e suplementado com inulina**. 2008. 133fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

NEGREIROS, G. A. **Eficiência econômica na produção leiteira: o caso da Cooperativa agropecuária tocantinense – CAT**. 2009. 125fls. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Agronegócio) – Universidade Federal do Tocantins. Palmas, 2009.

NIKAEDO, P. H. L.; AMARAL, F. F.; PENNA, A. L. B. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado proteico de soro e misturas de gomas carragena e guar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.40, n.3, p.397-404, 2004.

OLIVEIRA, M. **Consumo de probióticos em benefício da saúde**. 2010. Disponível em: <<http://www.brasileconomico.com.br>>. Acesso em: 22 de maio de 2012.

OLIVEIRA, A. P. V.; FRASSON, K.; YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T. Medida instrumental de cor em sobremesas lácteas de chocolate: uma técnica de baixo custo e versátil utilizando câmara digital. **Revista Brazilian Journal of Food Technology**. v.6, n.2, p.191-196, 2003.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.3, p. 251-260, 2004.

PORCENTAGEM..., 2008. **Porcentagem de lactose em produtos lácteos**. Disponível em: <<http://www.semlactose.com/index.php/2008/02/03/porcentagem-de-lactose-em-produtos-lacteos/>>. Acesso em 12 jun 2012.

PROBIÓTICO...2004. **Probiótico *Lactobacillus acidophilus***. Disponível em:<http://www.mapric.com.br/anexos/boletim498_14112007_084454.pdf>. Acesso 19 abr.2012

RODRIGUES, J. B. **Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2012. 132 fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SANTIN, J. **Alimentos lácteos funcionais: facilitando os hábitos saudáveis de consumo**. 2008. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acesso em: 23 de maio de 2012.

SILVA, N. da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, S. V. da. **Desenvolvimento de iogurte próbiotico com prebiótico**. 2007. 107 f. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de(Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

SOUZA, C. H. B. **Influência de uma cultura *starter* termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico**. 2006. 110fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOUZA, F. S.; COCCO, R. R.; SARNI, R. O. S.; MALLOZI, M. C.; SOLÉ, D. Probióticos, prebióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas: revisão. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.1, p.86-97, 2010.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 3, p.16-33, 2008.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Colour and consistency of semi-solid dairy desserts: instrumental and sensory measurements. **Journal of Food Engineering**. p.655-661, 2007.

VIDIGAL, M. C. T. R. **Caracterização reológica e sensorial de sobremesa láctea diet contendo concentrado protéico de soro**. 2009. 101fls. Dissertação (Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

VIEIRA, T. A. **Desenvolvimento de sobremesa láctea simbiótica**. 2011. 90fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos), Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, São Paulo, 2011.

ZIEGLER, J. R., AUGUSTO, M. M. **Influência do soro de leite na composição físico-químico da sobremesa láctea tipo mousse**. In: XXI Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia e VI Feira de Protótipos, 2006, Rio Grande do Sul.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. **Probiotics and prebiotics**.

Disponível

em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2012.