



Universidade Norte do Paraná

UNOPAR

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

MARIA BEATRIZ ODEBRECHT CARVALHO DE MENDONÇA

**VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS
EM LEITES FERMENTADOS COMERCIALIZADOS EM
LONDRINA – PR**

Londrina
2010

MARIA BEATRIZ ODEBRECHT CARVALHO DE MENDONÇA

**VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS
EM LEITES FERMENTADOS COMERCIALIZADOS EM
LONDRINA – PR**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lina Casale Aragon Alegro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Elsa Helena Walter de Santana

LONDRINA
2010

MARIA BEATRIZ ODEBRECHT CARVALHO DE MENDONÇA

**VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM LEITES
FERMENTADOS COMERCIALIZADOS EM LONDRINA – PR.**

Dissertação apresentada à UNOPAR – Universidade Norte do Paraná, no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, com nota final igual a _____, conferida pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Kátia Sivieri
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa
Universidade Norte do Paraná

Londrina, 13 de dezembro de 2010.

Dedico este trabalho á minha orientadora,
Prof^a.Dr^a. Lina Alegro, pelo incentivo e apoio
que me deste nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela a força e a graça deste mestrado.

Ao Profª Drª Lina Alegro, minha orientadora e amiga de todas as horas, que me acompanhou e me orientou para a elaboração deste trabalho

Ao gerente do Mercado Musamar, Jorge, pela a ajuda no fornecimento das amostras.

Ao técnico do laboratório Jorge Donato, pela paciência e companherismo.

Aos meus pais, pelo auxílio nesta pesquisa.

MENDONÇA, Maria Beatriz Odebrecht Carvalho de. **Viabilidade de microrganismos probióticos em leites fermentados comercializados em Londrina – PR.** 2010. 30p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2010.

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos capazes de produzir efeitos benéficos sobre seu hospedeiro, quando consumidos em quantidades adequadas. São utilizados para prevenção de patologias, regulação da microbiota intestinal, distúrbios do metabolismo gastrointestinal e como imunomoduladores. Porém, alimentos ou suplementos alimentares devem conter culturas probióticas viáveis, em contagens acima de 10^6 UFC/mL durante todo período de validade do produto para que exerçam esse efeito benéfico. O objetivo deste trabalho foi avaliar três marcas comerciais de leite fermentado probiótico, sendo 10 lotes de cada, a fim de se verificar a viabilidade do microrganismo probiótico, a cada 10 dias, durante a vida-de-prateleira do produto. Para isso, as amostras foram diluídas e, as diluições, semeadas em ágar MRS adicionado de sorbitol, quando declarada a presença de *Lactobacillus casei*, e em MRS acidificado, quando declarada a presença de *Lactobacillus paracasei*. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37 °C. Após 72 horas foi feita a contagem das colônias e os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de colônia (UFC) por mL. Todos os lotes, independente do dia avaliado, apresentaram populações de microrganismos probióticos acima de 10^7 UFC/mL, demonstrando que o leite fermentado é um ótimo veículo para adição do microrganismo probiótico.

Palavras-chave: Probióticos. Leites fermentados. *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus paracasei*. Viabilidade microbiana.

MENDONÇA, Maria Beatriz Odebrecht Carvalho de. **Viability of probiotic microorganisms in fermented milks commercialized in Londrina – PR.** 2010. 30p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms capable of producing beneficial effects on its host when consumed in adequate amounts. They are used in prevention of diseases, regulation of intestinal flora, gastrointestinal and metabolic disorders such as immunomodulators. However, foods or dietary supplements must contain viable probiotic cultures in counts above 10^6 CFU / mL during the entire period of the product to exert this beneficial effect. The aim of this study was to evaluate three brands commercial fermented milk probiotic batches of 10 each, in order to check the viability of probiotic microorganisms, each 10 days, during the shelf-life of the product. For this, the samples were diluted, the dilutions, plated on MRS agar supplemented with sorbitol, when declared presence of *Lactobacillus casei*, and acidified MRS, declared when the presence *Lactobacillus paracasei*. The plates were incubated anaerobically at 37 °C. After 72 hours the count was made of the colonies and the results were expressed as Colony forming units (CFU) per mL. All lots, regardless of the day evaluated, showed populations of probiotic microorganisms above 10^7 CFU / mL, showing that milk is a great vehicle for adding probiotic microorganism.

Key-words: Probiotics. Fermented milks. *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus paracasei*. Microbial viability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Alimentos Funcionais.....	12
3.2 Microrganismos probióticos.....	13
3.3 Viabilidade de microrganismos probióticos em produtos lácteos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Coleta das amostras.....	19
4.2 Preparo das amostras.....	19
4.3 Quantificação da população de <i>Lactobacillus casei</i>	19
4.4 Quantificação da população <i>Lactobacillus paracasei</i>	20
4.5 Determinação da viabilidade dos microrganismos probióticos durante a vida-de-prateleira.....	20
4.6 Análise dos dados.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÃO.....	26
7 REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação com a alimentação saudável, aliada à diversidade de tecnologias na área de alimentos, fez com que diversos produtos com boa qualidade nutricional e propriedades funcionais fossem elaborados, com o intuito de promover benefícios à saúde.

A utilização de culturas probióticas, pela indústria de laticínios, vem ganhando destaque, com o lançamento, no mercado, de uma série de produtos funcionais. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, exercem efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor.

Dentre esses benefícios à saúde, além do controle da microbiota intestinal, há outros já comprovados, tais como: estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção dos ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estimulação do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas.

Porém, sabe-se que, para que esses efeitos benéficos ocorram, a dose mínima diária da cultura probiótica ingerida deve ser de 10^8 a 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo diário de 100 g de produto que contenha 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL.

A adição dos probióticos ao leite fermentado é prática amplamente adotada pelos laticínios. Porém, não há estudos suficientes sobre a sobrevivência dos microrganismos probióticos durante a estocagem refrigerada. Considerando os fatores que interferem na viabilidade dos microrganismos nos produtos, como a refrigeração e a acidez, a quantificação da população de probióticos durante a vida-de-prateleira do produto é essencial.

Desta forma, este trabalho poderá fornecer maiores informações sobre a viabilidade dos lactobacilos presentes em algumas marcas de leite fermentado comercializadas em Londrina, durante sua vida de prateleira e, conseqüentemente, sobre a manutenção de seus efeitos benéficos à saúde do consumidor.

2 OBJETIVOS

Quantificar a população de microrganismos probióticos em três marcas de leites fermentados comerciais, verificar se estão de acordo com o exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e acompanhar sua viabilidade durante a vida-de-prateleira.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Com o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, a sociedade necessita vencer novos desafios, utilizando-se de conhecimentos científicos e de novas tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida. Além disso, a sociedade moderna tem se tornado cada vez mais complexa, modificando os padrões de vida. As pessoas freqüentemente mostram sintomas de cansaço, depressão e irritação, ou mais comumente uma forma de estresse (ROBERFROID, 2002).

Considera-se que a alimentação é o principal fator que contribui para um estilo de vida saudável, podendo reduzir, consideravelmente, os riscos de doenças, além de promover a saúde. Paralelamente, os consumidores procuram por alimentos que sejam, ao mesmo tempo, saudáveis, nutritivos e saborosos (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008).

Todos esses fatos têm colaborado para a criação de um mercado lucrativo para uma série de novos produtos enriquecidos com componentes fisiologicamente ativos, uma das prioridades de pesquisa da indústria de alimentos (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008).

Os alimentos funcionais fazem parte dessa concepção de alimentos (MORAES; COLLA, 2006). São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde (ROBERFROID, 2002). São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças (MORAES; COLLA, 2006).

Para que um alimento tenha suas propriedades funcionais reconhecidas é preciso comprovar que o mesmo interfere beneficemente em uma ou mais funções do organismo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, refletindo positivamente no bem-estar, na saúde e também na redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

Um alimento funcional pode ser classificado de acordo com o alimento em si ou conforme o componente nele presente (ARVANITOYANNIS; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005).

A suplementação de componentes com atividade reconhecidamente benéfica à saúde, como cálcio e vitaminas, constituía os alimentos funcionais de primeira geração. Desde a década de 90, esse conceito voltou-se principalmente para a adição, aos alimentos, de substâncias prebióticas e/ou microrganismos probióticos, ingredientes que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998).

3.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

As bactérias são freqüentemente lembradas por sua capacidade de desencadear infecção, mais do que por seus efeitos benéficos (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). Apesar disso, cada vez mais estudos clínicos e experimentais têm evidenciado que a interação microbiota-hospedeiro pode influenciar favoravelmente a saúde humana, de diversas maneiras (MARTINS, 2009).

O termo probiótico originou-se do grego e significa “pró-vida” (COPPOLA; CONCEIÇÃO; GIL-TURNES, 2004). Podem ser chamados probióticos os microrganismos capazes de promover o bem estar e a saúde, sendo assim, redutores de algumas patologias, auxiliando nas prevenções das mesmas (THAMER; PENNA, 2005).

Antigamente, os probióticos eram definidos como “suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Devido ao grande interesse pelo assunto, já surgiram várias outras definições. Contudo, a mais atual e aceita internacionalmente é que eles são “microrganismos vivos que, quando utilizados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Vários mecanismos de ação dos probióticos já foram descritos. Segundo Sleator; Hill (2009), há três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos. Bacteriocinas produzidas por eles podem destruir patógenos invasores, através da lise de suas células (Fig. 1A); células probióticas podem mimetizar receptores de superfície, impedindo a adesão do patógeno à membrana celular do hospedeiro (Fig. 1B); microrganismos probióticos podem neutralizar toxinas produzidas por microrganismos patogênicos, dentro do organismo humano (Fig. 1C).

De acordo com Fuller (1989), os probióticos podem, ainda, competir com os patógenos por nutrientes e sítios de ligação, alterar a atividade enzimática desses microrganismos e, também, estimular a imunidade do hospedeiro, por meio do aumento nos níveis de anticorpos e da atividade de macrófagos. A digestão parcial da lactose e o estímulo da atividade da lactase presente na mucosa intestinal são citados por Macfarlane; Cummings (1999).

Um microrganismo probiótico deve, necessariamente, sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (ácidos, bile e enzimas pancreáticas) e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Além do controle da microbiota intestinal, há ainda outros benefícios das culturas probióticas à saúde do hospedeiro, tais como: estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

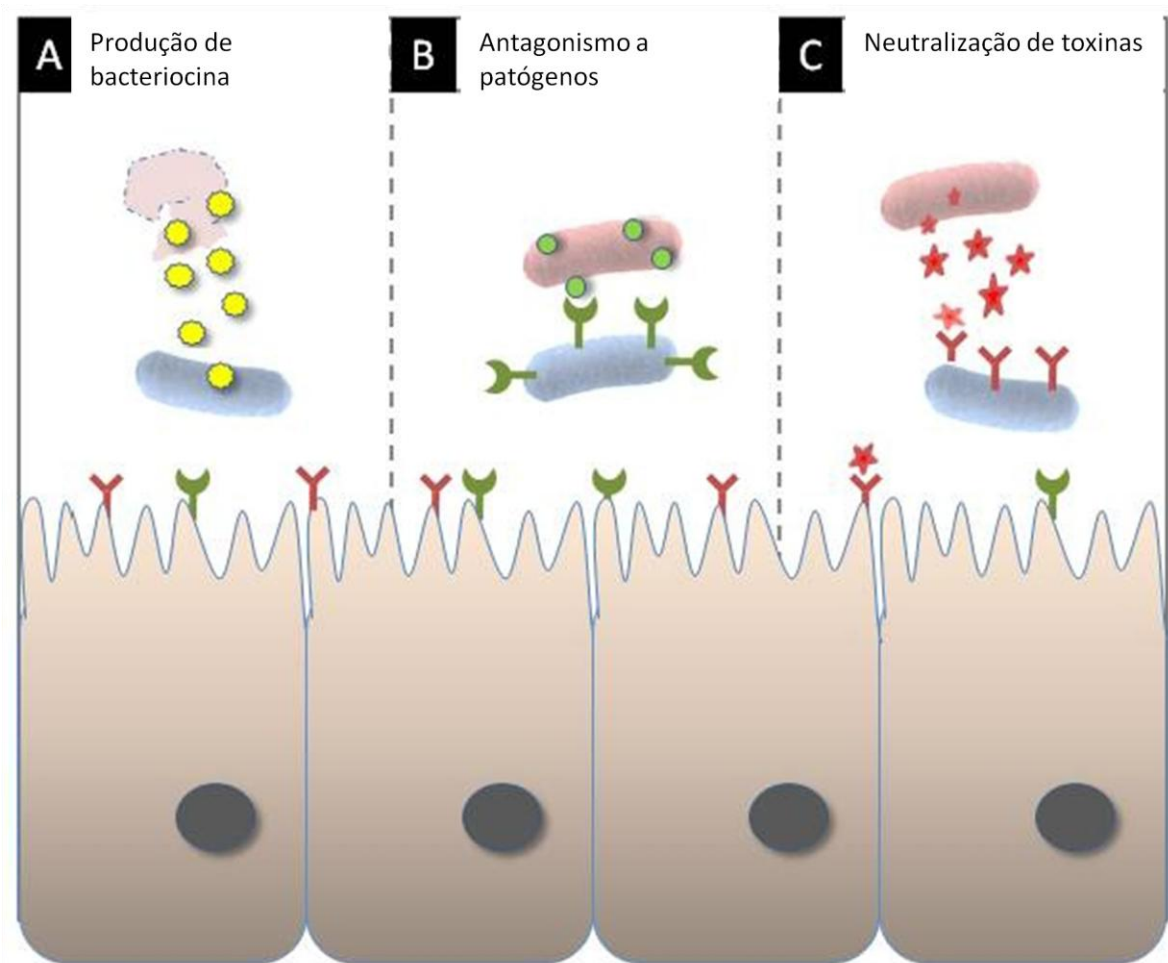


Figura 1. Mecanismos de atuação dos probióticos, de acordo com Sleator; Hill (2008).

Fonte: Sleator; Hill (2008)

Outros efeitos benéficos podem, também, serem atribuídos ao uso das culturas probióticas: diminuição do risco de câncer de cólon, prevenção contra doenças cardiovasculares, redução das concentrações plasmáticas de colesterol, efeito anti-hipertensivo, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite ulcerativa provocada por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (TUOHY et al., 2002).

Alguns gêneros bacterianos comumente utilizados como probióticos são *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Streptococcus*. Algumas cepas de fungos pertencentes ao gênero *Saccharomyces* também podem ser utilizadas (JIM; MARQUART; ZAO, 2000; GIBSON; ROBERFROID, 1995; ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001).

No gênero *Bifidobacterium*, destacam-se: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, as principais são: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (LEE et al., 1999).

A espécie *Lactobacillus casei*, junto com as espécies *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, fazem parte do “Grupo *Lactobacillus casei*” e são geralmente utilizadas na produção de leites fermentados e, também, como adjuntas de fermentação, na fabricação de queijos (BURITI et al., 2007).

Para se selecionar uma bactéria probiótica, deve-se utilizar alguns critérios: gênero de origem humana; estabilidade frente ao ácido e à bile; capacidade de aderir à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano; capacidade de produzir compostos antimicrobianos; ser metabolicamente ativo no intestino; ter histórico de não patogenicidade; ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000).

Além disso, para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA et al., 2002).

As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem um número mínimo. A dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônia), o que corresponde ao consumo de 100 g de um produto que contenha 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE; SALMINEN, 1995; RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; RENHEIMER, 2000).

Assim, a cultura a ser empregada como suplemento alimentar deve apresentar uma propriedade fundamental que se refere a sua viabilidade durante o armazenamento do alimento utilizado como veículo, antes de seu consumo (GILLILAND, 1979). A viabilidade das bactérias probióticas pode ser comprometida pela presença de substâncias inibitórias que se formam durante a produção e o armazenamento do produto sob refrigeração, o estado fisiológico dos microrganismos probióticos adicionados, as condições físicas de estocagem (tempo, temperatura), a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de água, conteúdo de oxigênio), as condições de cultivo e possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas *starter* (SHAH, 2000; HELLER, 2001).

3.3 USO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS

Já há alguns anos têm-se procurado desenvolver produtos com boa qualidade e que possuam um valor agregado, trazendo benefícios à saúde dos consumidores. Inúmeras pesquisas sobre o desenvolvimento de novos produtos probióticos vêm sendo realizadas, no sentido de atender a essa tendência mundial.

A indústria de laticínios é um dos segmentos que apresenta maior número de lançamentos de produtos funcionais contendo culturas probióticas. Segundo Gomes; Malcata (2008) existem, no mercado mundial, cerca de 80 produtos lácteos probióticos comerciais, os quais são produzidos, principalmente, no Japão, que lidera o mercado, na Comunidade Européia e nos EUA. Os produtos mais comuns são leites fermentados, iogurtes e queijos, nos quais, além da cultura *starter* convencional, os probióticos são adicionados.

No Brasil, os produtos lácteos funcionais probióticos, vêm sendo produzidos, principalmente, com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus casei*. São encontrados no mercado brasileiro, alguns produtos alimentícios contendo probióticos, como leite fermentado aromatizado ou não, iogurtes (OLIVEIRA et al., 2002) e queijos.

Várias pesquisas realizadas em nosso país demonstram esse aumento do desenvolvimento de produtos lácteos utilizando-se culturas probióticas (BURITI, 2005; FUCHS et al., 2006; THAMER; PENNA, 2006; CARDARELLI, 2006; HUNGRIA; LONGO, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram avaliadas três marcas de leites fermentados que declaram a presença de microrganismos probióticos, comercializados na cidade de Londrina (PR). De cada marca, foram analisados 10 lotes. A seleção do produto foi feita sem levar em consideração o fato de haver ou não alegação de propriedade funcional no rótulo. As amostras foram adquiridas em mercados da cidade escolhidos aleatoriamente e, no momento da coleta, a temperatura de estocagem foi aferida e a data de validade do produto registrada.

As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas de material isotérmico, contendo cubos de gelo, e transportadas, num período inferior a duas horas, para o Laboratório do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, da Universidade do Norte do Paraná, onde foram realizadas as análises. Os lotes foram mantidos sob refrigeração (4C°) e cada um foi avaliado após 10, 20 e 30 dias da data de fabricação.

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de leite fermentado foram identificadas por números e letras. A homogeneização das amostras foi efetuada na própria embalagem e, após a abertura das mesmas, assepticamente, alíquotas de 10 mL de amostra foram transferidas para frascos de diluição contendo 90 mL de água peptonada esterilizada (0,1% p/v). A partir daí foram efetuadas diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Lactobacillus casei*

Nos leites fermentados que declaram a presença de *Lactobacillus casei*, a quantificação do microrganismo nas amostras foi

realizada utilizando-se a técnica de semeadura em profundidade em ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) adicionado de 1% de sorbitol, com incubação a 37°C por 72 horas, em anaerobiose. Terminado o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias típicas dos lactobacilos (colônias cor creme, de diâmetro pequeno), e os resultados foram expressos em UFC/mL (RAVULA; SHAH, 1998).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Lactobacillus paracasei*

Nos leites fermentados que declaram a presença de *Lactobacillus paracasei*, foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade em ágar MRS acidificado com ácido acético (pH 5,4), com incubação a 37°C por 72 horas, em anaerobiose. Terminado o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias típicas dos lactobacilos (colônias cor creme, de diâmetro pequeno), com resultados expressos em UFC / mL (GUERROUE; BENEDET, 2006).

4.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS DURANTE A VIDA-DE-PRATELEIRA

Para a determinação da viabilidade das cepas nos produtos, durante a vida-de-prateleira (declarada pelo fabricante), foi realizada a contagem da população dos probióticos, conforme descrita nos itens 4.3 e 4.4, nos tempos 10, 20 e 30 dias.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores das populações de *L. casei* e *L. paracasei* foram expressos em médias e medidas de variabilidade. Para se comparar as populações do microrganismo durante os diferentes dias de vida-de-prateleira, foi utilizado um modelo de efeitos mistos (LITTEL et al., 1996). Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS, versão 8.02.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 mostra as populações médias dos microrganismos probióticos (log UFC/mL) encontradas para cada uma das três marcas de leite fermentado analisadas, em cada dia de análise, além dos desvios padrões.

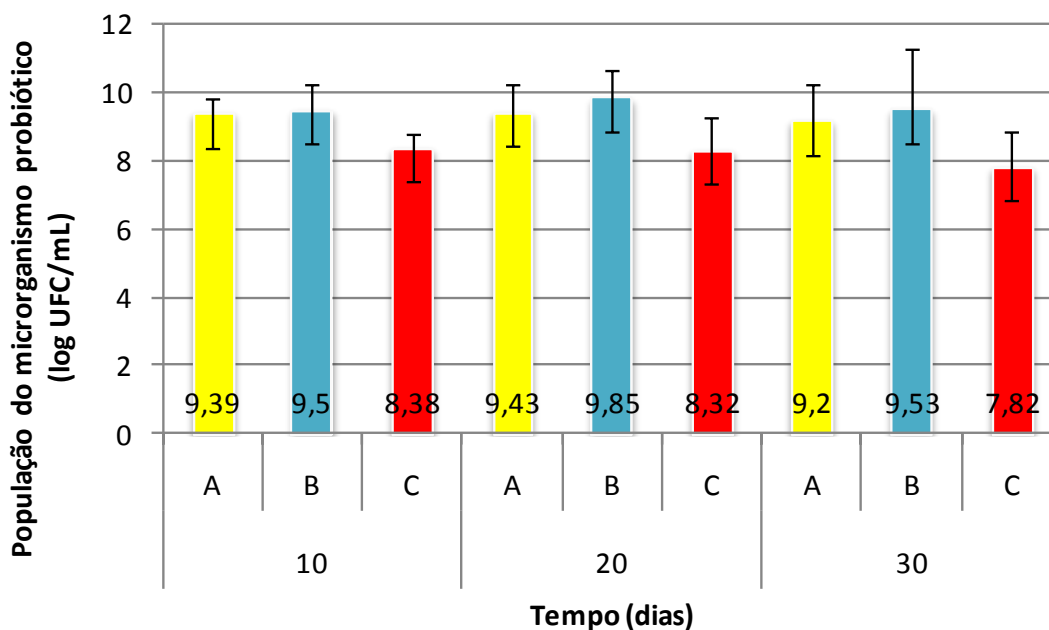


Figura 2. Populações médias de *Lactobacillus* (log UFC/mL) e desvios padrões observados nas três marcas de leites fermentados, em cada dia de análise. A, B, C: marcas de leites fermentados; A = *L. casei*; B = *L. paracasei*; C = *L. casei*.

Observa-se, na Figura 2, que a marca B foi a que apresentou populações médias mais altas de microrganismo probiótico. A marca A apresentou valores intermediários, e a C, os menores. Porém, independentemente da marca avaliada, a população de *Lactobacillus* foi sempre maior que 6 log.

Sabe-se que os probióticos só exercem as funções benéficas quando a população presente no produto se encontra acima de 10^6 UFC/mL na legislação. Assim, durante todo o tempo de vida de prateleira dos produtos avaliados, esses valores foram atingidos, podendo-se concluir que a ingestão do produto pode trazer benefícios ao consumidor.

Analisando-se as contagens de *Lactobacillus casei* obtidas para a marca A, verificou-se uma diminuição mínima dos valores, durante o armazenamento refrigerado, que não foi significativa ($p > 0,05$). Quando se avalia os resultados encontrados para a marca B, durante o prazo de validade dos produtos, verifica-se que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na população de *Lactobacillus paracasei* entre 10 e 20 dias de armazenamento. Após os 20 dias, esses valores diminuíram ($p > 0,05$). As populações de *Lactobacillus casei* observadas na marca C diminuíram durante a vida-de-prateleira, sendo que esse decréscimo somente foi estatisticamente significativo em 30 dias ($p < 0,05$).

Foram encontrados na literatura alguns trabalhos com objetivos semelhantes aos deste estudo. Rybka; Fleet (1997) examinaram quinze marcas de iogurtes australianos contendo os probióticos *L. acidophilus* ou *Bifidobacterium* sp. As populações viáveis de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* excederam 10^7 UFC/mL em 54% das amostras contendo *L. acidophilus* e 68%, das que continham *Bifidobacterium* sp. Apenas 24% e 14% das amostras contendo *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp., respectivamente, excederam 10^6 UFC/mL do microorganismo probiótico.

Foschino et al. (1997) avaliaram 43 amostras de leites fermentados contendo bactérias probióticas (*L. acidophilus* e/ou *Bifidobacterium*), de seis diferentes marcas, durante a vida de prateleira a 4 °C. Duas marcas de leites fermentados mantiveram as contagens de probióticos acima de 10^6 UFC/g até o final do prazo de validade. *Bifidobacterium* não foi encontrado, mesmo em pequenas concentrações e próximo à data de fabricação, em um dos produtos estudados. Em dois produtos, as espécies isoladas não foram as declaradas no rótulo. Amostras de diferentes lotes pertencentes à mesma marca mostraram grandes diferenças nas populações de microrganismos.

Leites fermentados naturais e adicionados de frutas, de quatro marcas comerciais australianas foram estudados por Micanel et al. (1997), durante a vida de prateleira a 4 °C. Os produtos eram fabricados com *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp, e os autores

concluíram que as bactérias permaneciam viáveis até seis semanas de armazenamento a 4 °C.

Nogueira et al. (1998), analisando a qualidade microbiológica de duas marcas de iogurtes probióticos portugueses durante a vida de prateleira. Os autores constataram que, embora a microbiota específica diminuiu durante o armazenamento, os iogurtes apresentaram populações de microrganismos probióticos de acordo com o recomendado.

Couret; Gueguen; Vernoux (2004) avaliaram 10 marcas de produtos contendo probióticos na França, sendo três deles, leites fermentados contendo *L. casei*. As populações médias do microrganismo probiótico observadas para as três marcas foram 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL e 10^5 UFC/mL. Os autores comentam que alguns produtos apresentaram população de *L. casei* mais baixas do que o declarado pelo fabricante, devido à perda de viabilidade das cepas ou falhas na cadeia de frio.

Gueimonde et al. (2004) avaliaram a sobrevivência de microrganismos probióticos em 10 leites fermentados comercializados na Espanha, durante armazenamento sob refrigeração. Os autores observaram que as populações de *Lactobacillus* diminuíram entre 0,75 e 1,85 log, dependendo do produto. Porém durante os 30 dias de análise, essas populações nunca foram menores que 10^5 UFC/mL.

No Brasil, Barreto et al. (2003) avaliaram 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comerciais, entre janeiro e agosto de 2001. Segundo os autores, na época, a maioria dos produtos comercializados no Brasil ainda não continha ou não declarava a presença de cepas probióticas de maior interesse, como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias. Os produtos que declaram a presença de culturas puras de *L. casei* apresentaram excelentes condições de viabilidade das cepas, ao contrário dos que declaram a presença de *L. acidophilus* e bifidobactérias, encontradas em contagens abaixo de 10^5 /g.

Ainda segundo Barreto et al. (2003), a perda de viabilidade desses microrganismos nos produtos fermentados parece não depender

apenas do tempo de estocagem, mas também da própria sensibilidade das cepas às condições de processo. Assim, a introdução de novos produtos no mercado, principalmente com alegação de propriedade funcional, exige inovações tecnológicas para a melhoria das condições de sobrevivência das espécies mais amplamente reconhecidas como probióticas (COURET; GUEGUEN; VERNOUX, 2004).

Hungria; Longo (2009) realizaram um estudo utilizando uma marca de leite fermentado desnatado adoçado, que continha, na embalagem, a informação de que o alimento possuía probióticos *Lactobacillus casei* na quantidade de 10^{10} a 10^{11} UFC/80mL, sendo considerado um alimento probiótico. A viabilidade do microrganismo *Lactobacillus casei* presente no leite fermentado foi analisada dez dias antes da data de vencimento indicada na embalagem, no dia do vencimento e dez dias após a data de vencimento. Os autores verificaram que no prazo de dez dias antes do vencimento do produto, a recuperação de células viáveis manteve-se com 10^7 UFC/mL. Já na data de vencimento, estes valores mantiveram-se em 10^5 UFC/mL. No período após a data de vencimento estipulada na embalagem, só foi possível a recuperação de $1,66 \times 10^4$ UFC/mL. Os resultados indicaram que a quantidade de microrganismos viáveis diminuiu progressivamente no alimento probiótico estudado.

Na figura 3, são mostradas as temperaturas das gôndolas de refrigeração verificadas nos momentos das compras dos produtos. Observa-se que, para as marcas A e B, nenhum lote estava em temperatura ideal de refrigeração (até 5 °C). Já o local das gôndolas onde estavam os lotes da marca C apresentaram temperaturas dentro do recomendado. A temperatura ideal das gôndolas deve ser abaixo de 5 °C, temperatura que inibe possíveis micro-organismos patogênicos existentes nos produtos refrigerados comercializados nos supermercados (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As gôndolas de 40% dos lotes da marca A e 60% da marca B apresentaram temperaturas na faixa de 6 a 8 °C. Os outros 60% dos lotes da

marca A, e 40% dos lotes da marca B, encontravam-se em gôndolas com temperatura variando entre 9 e 11 °C.

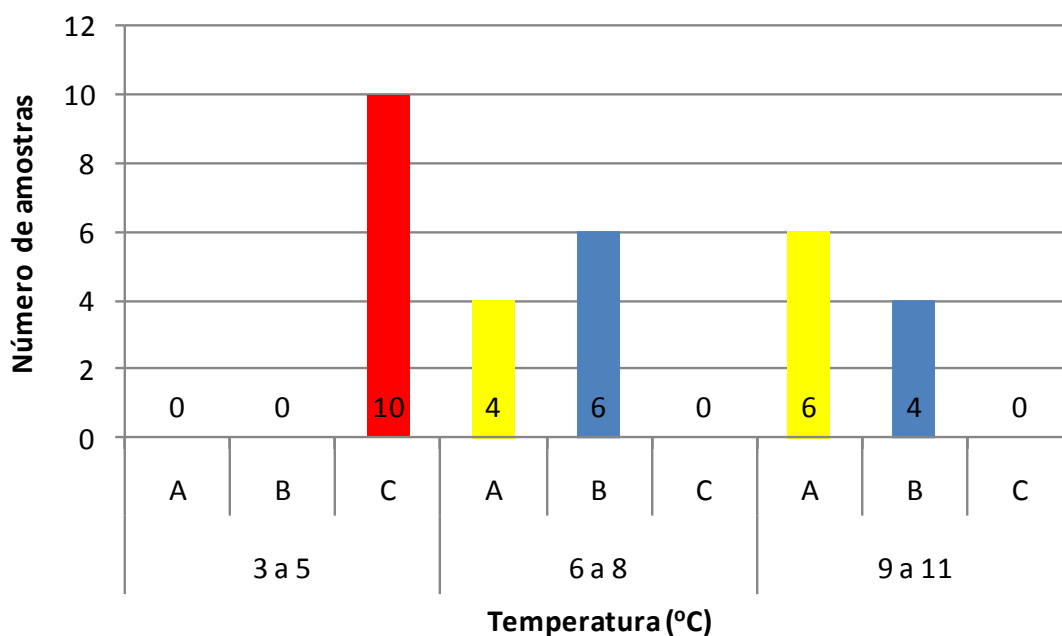


Figura 3. Temperatura das amostras no momento de recolhimento para análise.

As condições de temperatura a que os leites fermentados foram submetidos não afetaram a sobrevivência e a viabilidade de *L. casei*, durante toda a vida de prateleira do produto, já que todos se encontraram acima de 10^7 UFC/g, valor maior que o recomendado pela ANVISA.

6 CONCLUSÃO

As culturas probióticas mantiveram-se viáveis, em concentrações apropriadas, até o último dia de vida-de-prateleira dos leites fermentados analisados.

Todos os lotes avaliados apresentaram populações de *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus paracasei* maiores que 10^7 UFC/mL, demonstrando que esse alimento é um ótimo veículo para adição do microrganismo probiótico.

As condições de temperatura a que os leites fermentados foram submetidos nos mercados não afetaram a sobrevivência e a viabilidade do microrganismo probiótico, durante toda a vida de prateleira do produto.

7 REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-OLMOS, M.I.; OBERHELMAN, R.A. Probiotic agentes and diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clinical Infection Disease**, v.32, p.1567-76, 2001.
- ARVANITOYANNIS, L.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. **Functional foods**: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.45, n.5, p.385-404, 2005.
- BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.M.; BOTELHO, L.; ALMEIDA, C.G.; SABA, G.L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119-26, 2003.
- BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Revisões e Ensaio: Pediatria**, v.28, n.2, p.117-27, 2006.
- BURITI, F. C. A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. São Paulo, 2005. 86 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo (USP).
- BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C.; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**. V.104, p. 1605-1610, 2007.
- BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, R. H.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.
- CARDARELLI, H. R. **Desenvolvimento de queijo petit-suisse simbiótico**. São Paulo: 2006, Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo (USP).
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.
- COPPOLA, M.M.; CONCEIÇÃO, F.R.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-303, 2004.
- COURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.147-56, 2004.
- FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, October 2001. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em: 05 out. 2010.

FOSCHINO, R.; CAFARO, I.; OTTOGALLI, G. Studio sulla vitalità di batteri «probiotici» presenti in campioni di latti fermentati del commercio. **Ann. Microbiol. Enzimol.**, v.47, p.151-64, 1997.

FRANCO B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. 1ª. Ed. São Paulo Atheneu, 1996.

FUCHS, R.H.B.; TANAMATI, A.A.C.; SANTONIOLI, C.M.; GASPARELLO, E.A.; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. Curitiba: **Boletim CEPPA**. v.24, n.1, p.83-98, 2006.

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

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-12, 1995.

GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **Journal Food Protection**, v.42, n.2, p.164-167, 1979.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends Food Science Technology**, v.10, p.139-157, 2008.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v.37, p.839-50, 2004.

GUERROUE, J.L.; BENEDET, H.D.; FARIA, C.P. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.511-6, 2006.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.374-9, 2001.

HUNGRIA, T. D.; LONGO, P. L. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida-de-prateleira. **Revista Saúde**. v.3, n.3, p.10-5, 2009.

JIM, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine muçus. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.4200-4, 2000.

LEE, Y. K. et al. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LEE, Y-K; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**. v.6, p. 241-5, 1995.

LITTELL, R.C. et al. **SAS System for Mixed Models**, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1996.

McFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and probiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v.318, p.999-1003, 1999.

MARTINS, F.O. 100 Trilhões de bactérias no nosso corpo, precisamos de probióticos? **Revista Nutrição em Pauta**, n.94, 2009.

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

MORAES, F.P., COLLA, L.M. Alimentos Funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.109-22, 2006.

NOGUEIRA, C., ALBANO, H., GIBBS, P., TEIXEIRA, P. Microbiological quality of portuguese yogurts. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, p.19-21, 1998.

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

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

RYBKA, S., FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Aust.**, v.49, n.10, p.471-75, 1997.

RYBKA, S.; KAILASAPATY, K. The survival of cultures on the survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. **The Australian Journal of the Dairy Technology**, v.50, n.2, p.51-7, 1995.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, Suppl. 2, p. 105-110, 2002.

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

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

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, n. 3, p. 91-9, 2003.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

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

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.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-95, 2006.

TUOHY, K.M. et al. Using probiotics and prebiotics bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.721-9, 2002.

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

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and sybiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Internacional Dairy Journal**, v. 8, p. 473-9, 1998.