



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

SUENIA SOARES FERNANDES

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CULTURAS NATIVAS DE LACTOBACILOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS
DE DERIVADOS LÁCTEOS ADICIONADOS DE PRODUTOS OBTIDOS DA
CASCA DE JABUTICABA**

CAMPINA GRANDE

2016

SUENIA SOARES FERRENDDES

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CULTURAS NATIVAS DE LACTOBACILOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS
DE DERIVADOS LÁCTEOS ADICIONADOS DE PRODUTOS OBTIDOS DA
CASCA DE JABUTICABA**

Monografia apresentada ao Curso de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba em cumprimento à exigência para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Flavia Carolina Alonso Buriti

CAMPINA GRANDE

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

F363i Fernandes, Suênia Soares.

Influência da adição de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. sobre as características microbiológicas de derivados lácteos adicionados de produtos obtidos da casca de jabuticaba [manuscrito] / Suênia Soares Fernandes. - 2016.
50 p.

Digitado.

Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti, Departamento de Farmácia".

1. Probióticos. 2. Produtos lácteos. 3. *Lactobacillus* sp. 4. *Myrciaria cauliflora*. I. Título.

21. ed. CDD 637

SUENIA SOARES FERNANDES

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CULTURAS NATIVAS DE LACTOBACILOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS
DE DERIVADOS LÁCTEOS ADICIONADOS DE PRODUTOS OBTIDOS DA
CASCA DE JABUTICABA**

Monografia apresentada ao Curso de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia

Aprovada em 25 / 05 /2016.

Flávia Carolina Alonso Butiti

Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Butiti/ UEPB

Orientadora

Karlete Vânia Mendes Vieira

Prof.^a Dr.^a Karlete Vânia Mendes Vieira/ UEPB

Examinadora

Eliane Rolim Florentino

Prof.^a Dr.^a Eliane Rolim Florentino/ UEPB

Examinadora

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para conseguir concluir mais uma etapa minha vida.

À minha orientadora, Dr.^a Flávia Carolina Alonso Burity, pelos ensinamentos e pelo tempo e paciência a mim dedicados.

Às professoras Eliane Rolim Florentino e Karlete Vania Mendes Vieira, por aceitarem compor a minha banca.

À minha família, por todo amor e incentivo, em especial, à minha mãe Regina, por todas as orações que me dedicou.

Ao meu amigo Jocimar, pelo companheirismo e amizade, que me deram força para enfrentar os momentos difíceis, durante esses cinco anos.

Aos meus colegas de classe pelos momentos de amizade, em especial aos colegas de estágio, pelo apoio que me deram na elaboração deste trabalho.

À Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral - CE) e à empresa DuPont, pelas culturas cedidas à pesquisa.

Ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA/UEPB), bem como a todos os seus membros e funcionários, pela colaboração para a realização da pesquisa.

RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A indústria de laticínios, atualmente, está entre as que disponibiliza maior número de alimentos contendo culturas probióticas. Tradicionalmente, produtos lácteos, como iogurtes e bebidas lácteas, apresentam polpas de fruta em sua composição. A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) é um fruto tropical que apresenta características nutricionais importantes; sua casca possui altos teores de compostos fenólicos, o que contribui para sua elevada capacidade antioxidante. Este trabalho teve por objetivo avaliar influência da adição de culturas nativas de *Lactobacillus* sp. com potencial probiótico sobre as características microbiológicas de bebida láctea fermentada e sobremesa láctea adicionadas de produtos derivados da casca de jabuticaba. Foram avaliados três tratamentos para a bebida láctea: B1 (cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* TA40); B2 (*S. thermophilus* TA40 + cultura probiótica comercial de *Lactobacillus rhamnosus* LR32); B3 (*S. thermophilus* TA40 + cultura nativa de *Lactobacillus plantarum* CNPC 003); e três tratamentos para a sobremesa láctea: S1 (*L. rhamnosus* LR32); S2 (cultura nativa de *Lactobacillus mucosae* CNPC 007); S3 (cultura nativa de *L. plantarum* CNPC 020). Foram realizadas análises microbiológicas, durante o período de armazenamento (1, 7, 14 e 21 dias) para avaliar a viabilidade de *Lactobacillus* sp. em ambos os produtos, e de *S. thermophilus* nas bebidas lácteas, bem como, pesquisa de coliformes (a 35 °C e a 45 °C) e bolores e leveduras para os dois produtos e, exclusivamente para a sobremesa, *Staphylococcus* coagulase positiva. As análises mostraram populações de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* sp. superiores a 6 log UFC/g para todos os tratamentos dos produtos avaliados. A presença de bolores e leveduras foi observada em ambos os produtos, sendo o valor máximo observado de $1,6 \times 10^4$ UFC/g para a sobremesa. As populações de coliformes a 35°C estiveram abaixo dos valores tolerados pela legislação; não foram detectados coliformes a 45°C em nenhum dos tratamentos; entretanto, duas amostras dos tratamentos S2 e S3 apresentaram populações de *Staphylococcus* sp. superiores aos limites estabelecidos pela legislação. As bebidas lácteas e sobremesas avaliadas apresentaram populações dos microrganismos potencialmente probióticos, inclusive as bactérias nativas, em concentrações suficientes para resultarem em efeitos benéficos ao consumidor.

Palavras- chave: Probióticos. Produtos lácteos. *Myrciaria cauliflora*. *Lactobacillus* sp.

ABSTRACT

Probiotics are living microorganisms which when administered in adequate amounts provide health benefits to the host. Among other food industries, the dairy sector currently offers the majority of foods containing probiotic cultures. Traditionally, dairy products, such as yoghurts and milk drinks, have fruit pulps in their composition. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) is a tropical fruit that has important nutritional characteristics; its peel has high concentration of phenolic compounds, which contributes to a high antioxidant capacity. This study aimed to evaluate the influence of the addition of indigenous cultures of *Lactobacillus* sp. with probiotic potential on the microbiological characteristics of fermented milk drink and dairy dessert added of products derived from jaboticaba peel. Three treatments were evaluated for the fermented milk drink: B1 (starter culture of *Streptococcus thermophilus* TA40); B2 (*S. thermophilus* TA40 + commercial probiotic culture of *Lactobacillus rhamnosus* LR32); B3 (*S. thermophilus* TA40 + indigenous culture of *Lactobacillus plantarum* CNPC 003); and three treatments for the dairy dessert: S1 (*L. rhamnosus* LR32); S2 (indigenous culture of *Lactobacillus mucosae* CNPC 007); S3 (native culture of *L. plantarum* CNPC 020). Microbiological analyzes were performed during the storage period of the products (1, 7, 14 and 21 days) to assess the viability of *S. thermophilus* in milk drinks, *Lactobacillus* sp., besides the investigation of coliforms (at 35 °C and 45 °C), as well as yeasts and molds for the two products, and *Staphylococcus* coagulase positive exclusively for the dairy dessert. Analyses showed populations of *S. thermophilus* and *Lactobacillus* sp. higher than 6 log CFU/g for all treatments of products evaluated. The presence of yeasts and molds was observed from the first day of storage in both products, and the maximum value was observed for the dairy dessert (1.6×10^4 CFU/g). The populations of coliforms at 35 °C were below the values permitted by Brazilian standard ; not was detected coliform at 45° C in any of the treatments evaluated; however, two samples of desserts S2 and S3 showed populations of *Staphylococcus* sp. above the limits established by the Brazilian regulatory standards. The dairy beverages and desserts evaluated showed populations of potentially probiotic microorganisms, including indigenous bacteria, in sufficient concentrations to result in beneficial effects to the consumer.

Keywords: Probiotics. Dairy products. *Myrciaria cauliflora*. *Lactobacillus* sp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre a viabilidade de <i>Streptococcus thermophilus</i> nos diferentes tratamentos de bebida láctea B1, B2 e B3.	29
Tabela 2 – Comparação da viabilidade do microrganismo potencialmente probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> na bebida láctea B2 e na sobremesa S1.	31
Tabela 3 – Comparação da viabilidade dos microrganismos potencialmente probióticos nas bebidas lácteas fermentadas B2 e B3.	33
Tabela 4 – Comparação da viabilidade dos microrganismos potencialmente probióticos nas sobremesa lácteas S1, S2 e S3.	34
Tabela 5 – Comparação da viabilidade das cepas nativas potencialmente probióticas de <i>Lactobacillus</i> sp. na bebida láctea e nas sobremesas lácteas.....	36
Tabela 6 - Populações de microrganismos contaminantes detectadas nas bebidas lácteas B1, B2 e B3.	37
Tabela 7 – Populações de microrganismos contaminantes detectadas na sobremesa láctea durante 21 dias de armazenamento	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Alimentos funcionais.....	12
3.2 Probióticos.....	13
3.3 Bebida láctea fermentada e sobremesa láctea como veículos para a administração de probióticos	15
3.4 Bebida láctea	16
3.5 Sobremesas lácteas.....	18
3.6 Aproveitamento de ingredientes derivados da casca de jabuticaba na elaboração de produto lácteos	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 Obtenção dos frutos da jabuticaba.....	21
4.2 Obtenção dos extratos aquoso e hidroalcoólico da casca de jabuticaba	21
4.3 Preparo da calda e da geleia de casca de jabuticaba.....	22
4.4 Recuperação das culturas nativas potencialmente probióticas de <i>Lactobacillus plantarum</i> CNPC 020 e CNPC 003 e de <i>Lactobacillus mucosae</i> CNPC 007	23
4.5 Preparo da bebida láctea fermentada e da sobremesa láctea	23
4.5.1. Bebida láctea fermentada.....	23
4.5.2 Sobremesa láctea	25
4.6 Avaliação microbiológica	26
4.6.1 Análise de <i>Streptococcus thermophilus</i> (cultura “starter”) para a bebida láctea fermentada.....	26
4.6.2 Análise de <i>Lactobacillus</i> sp. (cultura probiótica) para a bebida láctea fermentada e para sobremesa láctea	27
4.6.3 Análise de contaminantes.....	27
4.6.3.1 Análise de bolores e leveduras.....	27

4.6.3.2 <i>Análise de coliformes totais e termotolerantes</i>	27
4.6.3.3 <i>Análise de Staphylococcus coagulase positiva para a sobremesa láctea</i>	28
4.7 Análises estatísticas	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Viabilidade da cultura <i>starter</i> nas bebidas lácteas.....	29
5.2 Viabilidade da cultura probiótica comercial na bebida láctea e na sobremesa.....	31
5.3 Viabilidade das cultura nativas potencialmente probióticas na bebida láctea e na sobremesa.....	32
5.4 Análise de microrganismos contaminantes.....	37
6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as exigências dos consumidores acerca da qualidade dos alimentos têm mudado consideravelmente. Existe, uma conscientização cada vez maior de que os produtos alimentícios contribuem diretamente para a saúde do indivíduo. Assim, os consumidores estão à procura de alimentos que, além de satisfazer a fome e fornecer os nutrientes necessários, sejam capazes de reduzir o risco do desenvolvimento de doenças e que melhorem o bem-estar físico e mental (VALENCIA, 2015). Entre esses alimentos, destacam-se aqueles que podem ser denominados funcionais, por resultarem em benefícios clínicos ou de saúde comprovados, além dos efeitos nutricionais conhecidos (SAAD et al., 2011).

Atualmente, inúmeras pesquisas na área de alimentos têm dado subsídios para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Dentre os alimentos que se enquadram nesta categoria, destacam-se os probióticos (LIMA et al., 2014).

A definição de probióticos aceita pela comunidade científica diz que estes são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Os lactobacilos e as bifidobactérias estão entre as bactérias mais utilizadas como probióticos. Contudo, para que um microrganismo seja considerado probiótico é necessário que este apresente características como: ter a capacidade de resistir ao suco gástrico, aos sais biliares e às enzimas digestivas, capacidade de aderir à mucosa intestinal, conviver com a microbiota normal do intestino e ser capaz de produzir substâncias que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis, além de apresentar estabilidade quando incorporados em alimentos (GALLINA et al., 2011).

A indústria de laticínios está entre as que apresentam maior crescimento na disponibilização de produtos funcionais, em especial leites fermentados, como o iogurte, e bebidas à base de soro de leite, em que essa funcionalidade

é efetivada por meio da utilização de culturas probióticas (MACEDO et al., 2008).

Os produtos lácteos apresentam características tecnológicas que favorecem a sobrevivência dos probióticos. Em vista disso, indústria de laticínios tem se valido desses microrganismos para o desenvolvimento de novos produtos (SAAD et al., 2011).

A maioria dos produtos lácteos disponíveis no mercado, como iogurtes e bebidas lácteas apresenta polpa e extrato de frutas em sua composição (ZICKER, 2011). Entretanto, durante o processamento de algumas frutas, boa parte das substâncias de interesse é desprezada nas cascas, sementes e bagaços, gerando toneladas de resíduos. Desse modo, é de grande interesse agregar valor a estes subprodutos, uma vez que a utilização desses resíduos serviria para enriquecer a alimentação humana e diminuiria a poluição (MARQUES, 2013).

A jabuticaba é um fruto tropical que apresenta características nutricionais importantes, sendo excelente fonte de carboidratos, fibras, ferro, cálcio e fósforo. Sua casca possui altos teores de compostos fenólicos como antocianinas, flavonoides e taninos, o que contribui com sua elevada capacidade antioxidante (MARQUETTI, 2014).

Nesse contexto a incorporação de produtos oriundos da casca da jabuticaba em alimentos lácteos probióticos seria uma alternativa para agregar valor e aumentar os benefícios desses produtos funcionais, além de diminuir os impactos ambientais gerados pelos resíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da adição de culturas nativas de *Lactobacillus* sp. com potencial probiótico sobre as características microbiológicas de bebida láctea fermentada e sobremesa láctea adicionadas de produtos derivados da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- a) avaliar a influência da cultura potencialmente probiótica comercial de *Lactobacillus rhamnosus* LR32 e da cultura nativa de *Lactobacillus plantarum* CNPC 003 sobre a viabilidade da cultura *starter* em bebidas lácteas fermentadas;
- b) comparar a viabilidade da cultura comercial probiótica de *L. rhamnosus* LR32 na bebida láctea fermentada e na sobremesa láctea;
- c) verificar a sobrevivência da cultura nativa potencialmente probiótica de *L. plantarum* CNPC 003 na bebida láctea fermentada em comparação com a cultura probiótica comercial;
- d) verificar a sobrevivência das culturas nativas potencialmente probióticas *Lactobacillus mucosae* CNPC 007 e *L. plantarum* CNPC 020 na sobremesa láctea em comparação com a cultura comercial;
- e) avaliar a presença de microrganismos contaminantes através de pesquisa de coliformes totais e termotolerantes, bolores, leveduras e *Staphylococcus coagulase* positiva.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Alimentos funcionais

A indústria alimentícia vem desempenhando um papel cada vez mais importante no modo de vida da população. Com isso, surge o desafio de atender a demanda dos consumidores por produtos saborosos, atrativos visualmente e que propiciem bem-estar e melhorias à saúde. Dentre tais alimentos estão os chamados alimentos funcionais, assim denominados por apresentarem além dos efeitos nutricionais já conhecidos, benefícios comprovados à saúde (SAAD et al., 2011).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). Esses alimentos são obtidos através da incorporação de certos ingredientes bioativos a alimentos que não os contém de forma natural, com o objetivo de reforçar a dieta com substâncias de efeito saudável, cuja ingestão não seria suficiente mediante a alimentação habitual (PALANCA et al., 2006).

Um alimento pode ser considerado funcional, se for satisfatoriamente demonstrado que ele afeta beneficemente uma ou mais funções no organismo, além dos efeitos nutricionais adequados, de maneira relevante para a melhoria do estado de saúde e bem-estar e/ou redução dos riscos de doenças. (ROBERFROID, 2007). Assim, alguns critérios devem ser observados para que um alimento seja caracterizado como funcional, dentre os quais estão: exercer ação metabólica ou fisiológica, contribuindo para a saúde física e para a diminuição de morbidades crônicas; criar efeitos positivos obtidos em quantidades não tóxicas, perdurando mesmo após suspensão de sua ingestão. Entretanto, deve-se salientar que os alimentos funcionais não são destinados ao tratamento ou cura das doenças. (BALDISSERA et al., 2011).

Dentre os componentes responsáveis por conferir funcionalidade a tais alimentos destacam-se, as fibras alimentares, os óleos de peixe, esteróis de

plantas, minerais, vitaminas, prebióticos e probióticos. (THAMER; PENNA, 2006).

A fisiologia do intestino, bem como a composição e a atividade do ecossistema microbiano responsável pela sua colonização, têm atraído um grande interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais. (ROBERFROID, 2005). Desse modo, nos últimos anos a produção de alimentos funcionais tem se voltado para aqueles aditivos alimentares capazes de exercer efeitos benéficos sobre a composição e/ou atividade da microbiota intestinal. Nesse contexto, os probióticos e prebióticos são os aditivos que compõem essa categoria de alimentos funcionais (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

3.2 Probióticos

O trato gastrintestinal humano é um microecossistema que, desde que esteja em equilíbrio, permite o desempenho normal de todas as funções fisiológicas do organismo. Tal equilíbrio pode ser alcançado através de uma suplementação sistemática da dieta com prebióticos, probióticos e simbióticos (SAAD, 2006).

Muitas definições de probióticos já foram publicadas, no entanto, a definição internacionalmente aceita, é a de que probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

A maioria dos microrganismos potencialmente probióticos pertence ao grupo das bactérias lácticas, como as espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium*, importantes constituintes normais da microbiota intestinal. Outros potenciais microrganismos utilizados na composição de produtos probióticos incluem *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, e espécies não pertencentes às bactérias lácteas, tais como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*. Entretanto, estudos têm também investigado

o potencial papel probiótico de outros microrganismos tais como as leveduras cujo principal exemplo é *Saccharomyces boulardii*, que normalmente não é encontrado como membro da microbiota intestinal humana (KEGEKE; DUARTE; MIGOWSKY, 2010; FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013).

Algumas características são necessárias para que um microrganismo seja considerado probiótico, dentre elas estão a capacidade de resistir ao suco gástrico, aos sais biliares e às enzimas digestivas, capacidade de aderir à mucosa intestinal, conviver com a flora normal do intestino e ser capaz de produzir substâncias que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis, além de apresentar estabilidade quando incorporados em alimentos (GALLINA et al., 2011).

Devido ao crescimento do mercado para alimentos probióticos, nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para investigar os potenciais benefícios proporcionados pela ingestão de microrganismos probióticos. A maioria destes efeitos está relacionada à saúde do trato gastrointestinal, como redução da colonização de patógenos, aumento da absorção de minerais e síntese de vitaminas, regularização do trânsito intestinal, alívio da intolerância à lactose, redução do inchaço e efeitos imunomoduladores entre outros. Têm sido estudados também, efeitos preventivos sobre o câncer de colón, diminuição das ulcerações causadas por *Helicobacter pylori* e controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*. No entanto, apesar do trato gastrointestinal ser o alvo da maioria dos produtos probióticos, o uso desses microrganismos pode causar efeitos benéficos em outras áreas do corpo como, boca, trato urogenital e pele. A administração de probióticos tem sido utilizada na prevenção e diminuição das infecções do trato reprodutivo e urinário e na diminuição dos sintomas pós-menopausa. O uso de cepas probióticas tem sido reportado para proteção contra infecções do trato respiratório e para melhoria da saúde oral através da diminuição da cárie dentária e da halitose. No que diz respeito à pele, os probióticos podem ser administrados por via oral para induzir uma resposta imune que tenha efeitos sistêmicos, por exemplo, no controle de inflamações na pele e de doenças dermatológicas como dermatite atópica e eczema que têm sido amplamente estudadas. Novas indicações também incluem o controle

da queda de cabelo e da acne (SAAD, 2006; FOLIGNÉ; DANEIL; POT, 2013; VANDENPLAS; HUYS; DAUBEC, 2014).

Para garantir os efeitos benéficos provenientes da administração de probióticos, o consumo destes microrganismos deve ser diário e em quantidades adequadas. Segundo Saad et al. (2011) alterações favoráveis na microbiota intestinal foram observadas com doses de 100g do produto alimentício contendo 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de microrganismos probióticos, o que corresponde a 10^6 a 10^7 UFC/g do bioproduto.

No Brasil, de acordo com a última atualização da lista das alegações de propriedade funcional ou de saúde e os requisitos específicos para a sua utilização, a ANVISA exige que a viabilidade dos microrganismos probióticos nos produtos seja comprovada pela empresa fabricante por meio de laudo de análise que apresente a quantidade mínima viável do microrganismo para exercer a propriedade funcional no final do prazo de validade do produto e nas condições de uso, armazenamento e distribuição (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). Portanto, a alegação de propriedade funcional ou de saúde deve ser proposta pela empresa e será avaliada pela ANVISA, caso a caso, com base nas definições e princípios estabelecidos na Resolução n. 18/1999 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

3.3 Bebida láctea fermentada e sobremesa láctea como veículos para a administração de probióticos

Em virtude da demanda voltada aos potenciais efeitos à saúde, o mercado para alimentos funcionais segue em expansão. Nesse sentido o desenvolvimento de alimentos probióticos é crescente (SAAD et al., 2011). Estima-se que os produtos probióticos representem 60 a 70% do mercado de alimentos funcionais (VALENCIA, 2015).

Os laticínios constituem-se como o principal veículo para o fornecimento das bactérias probióticas ao trato gastrintestinal humano, devido às características do leite, como sua composição química, efeito tamponante e

protetor, fatores fundamentais para essa expansão de lácteos probióticos (VALENCIA, 2015).

Verifica-se que, há vários anos uma variedade de laticínios probióticos encontra-se disponível no mercado, sendo os leites fermentados e os iogurtes os alimentos probióticos mais consumidos no mundo. Outros alimentos contendo esses microrganismos incluem sobremesas, leite em pó para neonatos, sorvetes e diversos tipos de queijo (SAAD et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014).

3.4 Bebida láctea

O termo “bebidas lácteas” apresenta sentido amplo e pode ser aplicado a uma diversidade de produtos fabricados com leite e soro (THAMMER; PENNA, 2006).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade das Bebidas Lácteas define bebida láctea como sendo um produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado ou em pó) adicionado ou não de produto(s) alimentício(s) ou substância alimentícia, gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005).

O soro de leite é considerado um subproduto da indústria de queijo, da caseína e de outros produtos lácteos acidificados. É obtido por meio do processo de coagulação do leite, que pode ser ácida, enzimática, láctea ou mista. O processo de coagulação do leite resulta em dois tipos de soro: o doce e o ácido. No Brasil, a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, provindo da fabricação de queijos por coagulação enzimática (como muçarela, prato, minas frescal, meia-cura e outros), que são os mais comercializados no país. O soro ácido, originário da manufatura de queijos de coagulação ácida, de consumo mais reduzido (ricota e requeijão) e da fabricação de caseína, praticamente inexistente no Brasil.

(POPPI et al., 2010). Existem ainda os soros obtidos a partir dos processos de coagulação láctica e mista. A coagulação láctica ocorre através da ação de bactérias lácticas presente nos fermentos, que dá origem a queijos tipo *Boursin* (VIEIRA, 2014). A coagulação mista do leite, por sua vez, é realizada por meio da adição de fermento iniciador (*starter*) e coagulante (coalho), esse tipo de coagulação destina-se a produção de queijo tipo *petit suisse* (EGITO et al., 2009).

Este produto secundário representa cerca de 85 a 95% do volume total de leite empregado na fabricação do queijo e contém aproximadamente 55% do total dos nutrientes do leite. Desse modo, o soro é fonte de lactose, cálcio, proteínas e vitaminas hidrossolúveis. A produção de soro atinge quantidades muito elevadas e, estima-se que, no Brasil, alcance valores próximos a 6 milhões de toneladas por ano (CUNHA et al., 2008; SIQUEIRA; MACHADO; STAMFORD, 2013).

Devido a isso, existe uma grande preocupação em gerar aplicabilidade ao soro de queijo em novos alimentos, visto que, no Brasil, cerca de 55% do soro não é aproveitado, gerando desperdício nutricional, financeiro e impactos ambientais, já que é um resíduo com alto teor orgânico (SIQUEIRA; MACHADO; STAMFORD, 2013).

Em nosso país, a produção de bebida láctea se constitui como uma das principais formas de aproveitamento do soro de queijo. As mais comercializadas são as bebidas fermentadas, que apresentam características sensoriais semelhantes ao iogurte (CALDEIRA, et al., 2010). Essas bebidas caracterizam-se por serem refrescantes, apresentarem textura suave e baixa viscosidade (ALMEIDA; TAMINE; OLIVEIRA, 2009). Complementarmente, o teor de lactose e outros nutrientes presentes no soro, fazem dele uma matéria-prima potencial para o cultivo de microrganismos probióticos, viabilizando a produção de bebidas lácteas fermentadas funcionais (SIQUEIRA; MACHADO; SATAMFORD, 2013).

Para Cunha et al. (2008), a conversão do soro de queijo em bebidas lácteas, fermentadas ou não, apresenta-se como uma das mais vantajosas opções para as indústrias, devido a fatores como, simplicidade do processo, possibilidade do uso de equipamentos já existentes na usina de beneficiamento

de leite e substituição do uso de soro em pó, reduzindo custos; além da redução de problemas relativos ao descarte.

3.5 Sobremesas lácteas

Diversos produtos podem ser desenvolvidos com a substituição de ingredientes menos desejáveis por outros de maior benefício, sem afetar a qualidade inicial. Atualmente, os consumidores buscam por sobremesas de baixa caloria e que apresentem alegações à saúde (SAAD et al., 2011).

Nesse contexto, a comercialização de sobremesas lácteas prontas para consumo tem apresentado considerável crescimento. Os ingredientes inovadores e os sistemas tecnológicos aplicados nas indústrias de laticínios têm proporcionado novas alternativas às sobremesas clássicas feitas em casa, permitindo a produção de sobremesas com novos sabores, com maior digestibilidade e maior valor nutritivo, sendo ainda possível a adição de ingredientes funcionais como probióticos em vários tipos de sobremesa, principalmente, naquelas que apresentam base láctea (SAAD, 2011; VIDIGAL et al., 2012).

No Brasil não existe uma legislação específica com definição de padrões de identidade e qualidade para sobremesas lácteas. A composição das sobremesas difere quanto aos ingredientes e suas concentrações utilizadas, assim como na forma de preparo, sendo possível englobar neste grupo todos os produtos em que o leite desempenhe um papel relevante na sua composição. Normalmente, estes produtos apresentam consistência semi-sólida e são basicamente formulados com leite, hidrocoloides, aroma e corantes. Sua estabilidade depende da tecnologia de fabricação, características intrínsecas de cada ingrediente e estocagem sob condições refrigeradas (ARES et al., 2012).

3.6 Aproveitamento de ingredientes derivados da casca de jabuticaba na elaboração de produto lácteos

A maioria dos produtos lácteos disponíveis no mercado apresenta sabores de fruta de clima temperado, como morango, ameixa e, pêssego; entretanto, o Brasil apresenta uma variedade de frutas de diferentes aromas e sabores que podem ser utilizadas para a fabricação de produtos lácteos (MENEZES, 2011). Além disso, durante o processamento de algumas frutas, boa parte das substâncias de interesse é desprezada nas cascas, sementes e bagaços, gerando toneladas de resíduos (MARQUES, 2013).

Uma tendência que vem crescendo nos últimos anos consiste no aproveitamento de resíduos (principalmente cascas) de certos frutos como matéria-prima para a produção de novos alimentos, perfeitamente passíveis de serem incluídos na alimentação humana (FERREIRA et., al, 2012). Assim, a utilização destes resíduos seria de grande interesse, uma vez que, além de enriquecer a alimentação, daria destino a estes subprodutos evitando a poluição ambiental (MARQUES, 2013).

Nesse contexto, pode-se destacar a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), fruta nativa do Brasil, conhecida desde a época do descobrimento, sendo encontrada em uma ampla faixa territorial que vai desde o Pará até o Rio Grande do Sul. Os frutos da jabuticabeira crescem no tronco da árvore e quando maduros apresentam cor roxa-escura ou preta. A polpa do fruto é branca, pouco ácida e muito saborosa (ALVES, 2011; LAMOUNIER et al., 2015).

A jabuticaba apresenta características nutricionais importantes, sendo excelente fonte de carboidratos, sais minerais, aminoácidos, ácido ascórbico, além de apresentar vitamina B1 e B2, em menores quantidades (WU; LONG; KENNELLY, 2013). Sua casca é rica em compostos fenólicos, como antocianinas e flavonoides, componentes capazes de complexar os radicais livres, inibindo a iniciação da cadeia de reações oxidativas promovidas por estes radicais, ou quebrar a cadeia de propagação destas reações, o que atrasa ou impede, por exemplo, as reações de oxidação lipídica em alimentos. Além disso, a ingestão de alimentos com um elevado teor de compostos fenólicos está associada a uma redução do estresse oxidativo, prevenção de

algumas doenças inflamatórias, prevenção de doenças cardiovasculares, proteção contra a obesidade e hipoglicemia, e melhora da memória (ALMEIDA et al., 2015).

Assim, tendo em vista as características nutricionais e antioxidantes da casca de jabuticaba, a incorporação de produtos obtidos a partir deste resíduo em derivados lácteos seria uma alternativa para reduzir o impacto ambiental desses resíduos ao mesmo tempo em que melhoraria as características do produto final trazendo benefícios a saúde do consumidor.

4 METODOLOGIA

As etapas de desenvolvimento dos produtos e de análises microbiológicas foram realizadas no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento e Extensão em Alimentos (NUPEA), Departamento de Química da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande, PB.

As cascas da jabuticaba foram processadas para obtenção dos extratos aquoso e hidralcoólico. O extrato hidralcoólico foi incorporado diretamente às formulações. O extrato aquoso, por sua vez, foi utilizado para o preparo da calda e da geleia. A calda foi adicionada tanto às sobremesas quanto às bebidas lácteas, servindo também de acompanhamento para as sobremesas. Já a geleia serviu de acompanhamento para as bebidas lácteas.

Foram produzidos e avaliados três diferentes tratamentos de bebida láctea: B1 – com a cultura *Streptococcus thermophilus* TA40, DuPont (controle); B2 - com *S. thermophilus* TA40 e a cultura comercial potencialmente probiótica de *L. rhamnosus* LR32 (padrão probiótico); B3 (teste) – produzida com *S. thermophilus* e a cultura nativa potencialmente probiótica de *L. plantarum* CNPC 003, EMBRAPA. As bebidas foram produzidas a partir de soro da fabricação de queijo. Três tratamentos de sobremesa láctea foram avaliados: S1 – com a cultura potencialmente probiótica comercial de *Lactobacillus rhamnosus* LR32, DuPont (padrão probiótico); S2 - com cultura nativa de *Lactobacillus mucosae* CNPC 007, EMBRAPA; e S3 – com cultura nativa de *Lactobacillus plantarum* CNPC 020, EMBRAPA.

As análises microbiológicas foram realizadas após 1, 7, 14, 21 de armazenamento. Foram avaliadas a viabilidade da cultura starter de *Streptococcus thermophilus*, nas bebidas lácteas, e de *Lactococcus* sp. tanto nas as bebidas lácteas quanto nas sobremesas. A presença de contaminantes nos dois produtos foi realizada, através da pesquisa de coliformes (a 35°C e a 45 °C) e de bolores e leveduras e, exclusivamente, para as sobremesas de *Staphylococcus coagulase positiva*.

Os dados foram tratados através do software *Statistica 8* e expressos em média \pm desvio padrão.

4.1 Obtenção dos frutos da jabuticaba

Os frutos foram obtidos em feiras livres da cidade de Campina Grande - PB durante o período da safra do ano de 2015. Inicialmente, esses frutos foram selecionados, lavados em água corrente e sanitizados com uma solução de água sanitária (0,2 mg/L de cloro ativo), durante 30 minutos. Em seguida, foram separadas, por despulpamento manual, as sementes, a polpa e as cascas, sendo, posteriormente, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas.

4.2 Obtenção dos extratos aquoso e hidroalcoólico da casca de jabuticaba

Para obtenção do extrato aquoso utilizado para o preparo da calda e da geleia, as cascas mergulhadas em água destilada foram acidificadas com suco de limão na proporção de 1:2:0,15 (casca de jabuticaba: água destilada: suco de limão) por 45 minutos para redução do sabor adstringente provocado pelos taninos. Em seguida, as cascas foram trituradas em liquidificador, utilizando uma proporção de 90,5 g de cascas para 170 g de água destilada, e coadas em rede de nylon (abertura de, aproximadamente, 0,300 mm) para que fossem obtidas partículas de tamanho padronizado. O filtrado foi utilizado para triturações sequenciais até que o extrato atingisse teor de sólido solúveis igual a 2,5%.

O resíduo oriundo da filtração foi utilizado para o preparo do extrato hidroalcoólico adicionado às formulações. Para esse fim, 10 g do resíduo da filtração foram reidratados com 5 ml de água destilada, por 1 hora. Após esse período, o mesmo foi adicionado de 90 ml de solução hidroalcoólica a 30% acidificada com ácido cítrico até pH 4 (para facilitar a extração dos compostos fenólicos), e levado para o banho de ultrassom (50 rpm) por duas horas, em temperatura de 50°C. Após este procedimento, o extrato foi filtrado em rede de nylon e levado para a secagem em estufa com circulação de ar (50°C) para evaporação do etanol e concentração até atingir um volume entre 5% - 6% do produto inicial.

4.3 Preparo da calda e da geleia de casca de jabuticaba

Para o preparo da calda, que foi incorporada à base láctea da sobremesa e que também serviu de acompanhamento para o mesmo produto, o extrato aquoso (72,58 g/100 g) foi adicionado de pectina (Grindsted Pectin YF310 Danisco, Dupont, Braband, Dinamarca, 0,42 g/100g) e açúcar (sacarose comercial, 27 g/100 g), e aquecido até obter teor de sólidos solúveis igual a 40,5%.

A calda incorporada à bebida láctea foi preparada em processo semelhante, sendo utilizados, neste caso, extrato aquoso (66,39 g/100 g), açúcar (33,19 g/100 g) e pectina, (0,42 g/100 g), sendo encerrado o aquecimento quando foi obtido teor de sólidos solúveis igual a 40%. Já para o preparo da geleia, utilizada como acompanhamento da bebida láctea, o extrato (66,4116 g/100 g) foi adicionado de açúcar (33,174 g/100 g), pectina (0,41 g/100 g) e de corante carmim de colchinilha (0,0044 g/100 g) Nesse caso, a geleia permaneceu sob aquecimento até que fosse atingida a concentração de 60% de sólidos solúveis.

4.4 Recuperação das culturas nativas potencialmente probióticas de *Lactobacillus plantarum* CNPC 020 e CNPC 003 e de *Lactobacillus mucosae* CNPC 007

As cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* CNPC 003 e CNPC 020, e *Lactobacillus mucosae* CNPC 007 foram previamente isoladas de leite de cabra e avaliadas quanto ao potencial probiótico (resistência às condições do trato gastrointestinal, desconjunção dos sais biliares, susceptibilidade a antibióticos, multiplicação no leite, entre outros testes) pela Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral, CE), sendo fornecidas na forma liofilizada pela instituição para o uso nos projetos de pesquisa do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos na UEPB.

A cepa nativa de *L. plantarum* CNPC 003 foi destinada ao tratamento B3 da bebida láctea; as cepas *L. mucosae* CNPC 007 e *L. plantarum* CNPC 020 foram, adicionadas, respectivamente, aos tratamentos S2 e S3 de sobremesa láctea.

Cada cultura nativa foi multiplicada, separadamente, em 10 mL de caldo de Man Rogosa Sharp (MRS), estéril a 36 °C por 24 horas. Em seguida, os caldos contendo cada cultura foram agitados em vórtex distribuídos em microtubos de 1,5 ml e centrifugados, a fim de que se separasse a cultura sedimentada dos demais componentes. O sobrenadante foi descartado e, para a recuperação das culturas, o precipitado foi lavado com solução salina por três vezes para completa retirada do material usado para a liofilização e do caldo MRS. As culturas contidas no microtubos (pré-inóculo) foram armazenadas sob refrigeração para serem ativadas em leite antes de serem adicionadas aos produtos.

4.5 Preparo da bebida láctea fermentada e da sobremesa láctea

4.5.1. Bebida láctea fermentada

Foram preparados três diferentes tratamentos de bebida láctea com geleia e calda de jabuticaba : B1 (controle) – produzido apenas com a cultura

iniciadora de *Streptococcus thermophilus* TA40 (Yo-Mix Yogurt Cultures, Dupont, Danisco, Sassenage, França); B2 (probiótico padrão) - produzido com *S. thermophilus* TA40 e a cultura comercial potencialmente probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (Florafit Probiotics, Dupont, Danisco, Madison WI, EUA); B3 (probiótico teste) – produzido com a adição de *S. thermophilus* TA40 e a cultura nativa potencialmente probiótica de *Lactobacillus plantarum* CNPC 003.

Os queijos utilizados para a obtenção do soro foram produzidos utilizando leite pasteurizado Cariri Light (Cooperativa Agropecuária do Cariri LTDA, Campina Grande, PB), coagulante Hannilase (Chr. Hansen, Valinhos, SP) e cloreto de cálcio, segundo a metodologia descrita por Florentino (1997). Após o preparo do queijo, o soro de leite foi acondicionado em sacos plásticos de nylon e armazenado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ao momento de sua utilização.

Para a produção da base láctea das bebidas foram utilizados os seguintes ingredientes: soro de queijo (84 g/100 g), açúcar (sacarose comercial, 8 g/100 g) e leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Araçatuba, SP, 8 g/100 g). Inicialmente, o soro de queijo foi tratado termicamente a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, para inativação das enzimas coagulantes. Após isso, o soro foi resfriado a, aproximadamente, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para adição do açúcar e do leite em pó (reconstituído de acordo com as instruções do fabricante). Em seguida, a mistura leite-soro-açúcar (base láctea) foi tratada termicamente a 85°C durante 30 minutos, sendo armazenada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da fermentação.

Para a etapa de fermentação, a base láctea pasteurizada foi aquecida a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a adição das culturas, de acordo com cada tratamento. Em todos os tratamentos (B1, B2 e B3), a cultura iniciadora de *S. thermophilus* TA40 foi adicionada na proporção de 0,003 g/100 g. No tratamento B2, foi adicionada a cultura de *L. rhamnosus* na proporção de 0,02 g/100 g. No tratamento B3 foi utilizada a quantidade recuperada da cultura nativa *L. plantarum* CNPC 003 no preparo do pré inóculo. As bases lácteas foram mantidas a $43 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante o tempo necessário para alcançar pH menor ou igual a 5,0 e acidez igual ou superior a 0,6 g de ácido láctico/100 g. Encerrado o processo de fermentação, a base láctea (90 g/100 g) foi misturada em liquidificador com pectina (YF310, Dupont, 1,75 g/100 g), ácido láctico alimentício (solução a 85%, Purac Síntesis, São Paulo, SP, 0,48 g/100 g), corante carmim de colchinilha (0,00045 g/100 g);

calda (5,7655 g/100 g) e extrato hidralcoólico (2 g/100 g). Após isso, porções de 85 g das bebidas lácteas foram acondicionadas em potes plásticos já contendo geleia de casca de jabuticaba (15 g), totalizando 100 g do produto final em cada pote, sendo, em seguida, refrigeradas a 4 ± 1 °C, durante 21 dias.

4.5.2 Sobremesa láctea

Três diferentes tratamentos de sobremesa láctea adicionadas de calda de casca de jabuticaba foram preparadas e avaliadas: S1 (tratamento probiótica padrão) – contendo a cultura comercial potencialmente probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (Florafit Probiotics, Dupont, Danisco, Madison WI, EUA) ; S2 – adicionado da cultura nativa de *Lactobacillus mucosae* CNPC 007; S3, no qual foi utilizada a cultura nativa de *Lactobacillus plantarum* CNPC 020.

Para o preparo dos inóculos, o leite em pó desnatado foi reconstituído de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, alíquotas de 11 mL foram adicionadas aos tubos de ensaio estéreis para o tratamento térmico e preparo dos inóculos (sendo considerada a utilização de 10 mL do inóculo para o preparo dos produtos e 1 mL para as análises de viabilidade da cultura no inóculo pronto). Para este fim, o leite foi tratado termicamente a 85°C por 30 minutos. Após isso, foi resfriado a 37 °C para que fossem adicionadas as culturas, de acordo com cada tratamento. No tubo de ensaio utilizado para o tratamento S1, foi adicionada a cultura de *L. rhamnosus* (0,22 g). Nos tubos de ensaios usados para os tratamentos S2 e S3 foram utilizadas as quantidades das culturas nativas de, respectivamente, *L. mucosae* e *L. plantarum* recuperadas durante o preparo do pré inóculo.

Para a produção da sobremesa foram utilizados os seguintes ingredientes: amido de milho (Maizena-Unilever, Garanhuns, PE, 2,1g /100 g), leite em pó desnatado (Molico-Nestlé, Araçatuba, SP, 8 g/ 100 g), água mineral (78,88 g/100 g), açúcar (sacarose comercial, 6,7 g/100 g), corante carmim de colchinilha (0,04 g/100 g), ácido láctico alimentício (solução a 85%, Purac Síntesis, São Paulo, SP, 0,58 g/100 g), pectina (YF310, Dupont, 0,9 g/100 g),

calda da casca de jabuticaba (1,8 g/100 g) e extrato hidralcoólico de casca de jabuticaba (1 g/100 g)

Para o preparo, da base láctea, o amido foi dissolvido em água por meio do agitador magnético. A pectina foi solubilizada aos poucos no leite e, em seguida, levada ao aquecimento juntamente com amido dissolvido. Quando a temperatura da base láctea atingiu 65 °C, foi adicionado o açúcar. A base láctea permaneceu sob aquecimento até atingir 85 °C, para aumento de consistência. Antes de desligar o aquecimento, adicionou-se a calda e o ácido láctico. Durante o resfriamento, quando foi atingida a temperatura de 40 °C, foi adicionado o corante e o extrato hidroalcoólico. Ao atingir a temperatura de 37°C, foram adicionados os inóculos da cultura comercial de *L. rhamnosus* LR32 no tratamento S1 e das culturas nativas de *L. mucosae* CNPC 007 e *L. plantarum* CNPC 020 em S2 e S3, respectivamente. Por fim, porções de 85 g das sobremesas lácteas foram acondicionadas em embalagens de polipropileno, contendo 15 g de calda, totalizando aproximadamente 100 g do produto final em cada pote e, em seguida refrigeradas a 4 °C

4.6 Avaliação microbiológica

Para a avaliação microbiológica da bebida láctea e da sobremesa láctea, porções de 25 g de cada produto foram homogeneizadas em 225 g de solução salina 0,85%. A partir dessa diluição inicial, foram preparadas diluições seriadas utilizando o mesmo diluente.

As análises dos produtos foram realizadas após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento.

4.6.1 Análise de *Streptococcus thermophilus* (cultura “starter”) para a bebida láctea fermentada.

A determinação de *Streptococcus thermophilus* se deu através do plaqueamento de 1 mL de cada diluição em ágar M17 (Difco) adicionado de lactose (OLIVEIRA et al.,2001), seguido de incubação em estufa microbiológica a 36 ± 2 °C por 72h.

4.6.2 Análise de *Lactobacillus* sp. (cultura probiótica) para a bebida láctea fermentada e para sobremesa láctea

Para a determinação do *Lactobacillus* sp. alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar MRS (Difco, Sparks, MD, EUA) fundido e resfriado. Unicamente para as análises da bebida láctea, foi necessária a acidificação do Ágar MRS com ácido acético glacial até pH 5,4 (OLIVEIRA et al., 2001), com o objetivo de inibir a multiplicação de *S. thermophilus*, o que dificultaria a contagem das colônias. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 36 ± 2 °C por 72 horas em estufa microbiológica.

4.6.3 Análise de contaminantes

4.6.3.1 Análise de bolores e leveduras

A análise de bolores e leveduras foi realizada através da técnica da semeadura em superfície, na qual 0,1mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} de cada tratamento foram adicionadas a placas de Petri contendo ágar batata (Himedia) previamente acidificado com ácido tartárico. Após o semeio as placas foram incubadas em temperatura ambiente por um período de 72 h (BRASIL, 2003).

4.6.3.2 Análise de coliformes totais e termotolerantes

A determinação de coliformes a 35 °C (totais) e a 45 °C (termotolerantes) foi realizada, através da determinação do número mais provável (NMP) de coliformes.

Para as análises de coliformes a 35 °C, alíquotas das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} de cada tratamento foram inoculadas em séries de 3 tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose (Himedia, Mumbai, India) a 2% e posteriormente incubadas em estufa a 36°C. Segundo esta metodologia, a presença de coliformes é evidenciada pela turbidez do meio ou pela formação

de gás nos tubos de Durhan produzida pela fermentação da lactose contida no meio.

A prova para coliformes a 45 °C foi realizada através da inoculação de alíquotas dos tubos positivos para coliformes totais em caldo EC (Himeidia) seguida de incubação em temperatura seletiva de 45 °C por 24-48h (BRASIL, 2003). A presença de coliformes a 45 °C é confirmada pela turbidez do meio ou presença de gás nos tubos de Durhan.

4.6.3.3 Análise de *Staphylococcus coagulase positiva* para a sobremesa láctea

Para a análise de *Staphylococcus coagulase positiva* da sobremesa láctea, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Manitol salgado (Himeidia) para semeadura em superfície. Após o semeio, as placas foram incubadas em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h.

4.7 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Inicialmente, esses dados foram submetidos à análise de normalidade (testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk) e de homogeneidade de variâncias (testes de Bartlett, Cochran e Hartley). Uma vez que foi confirmada a não-homogeneidade dos dados, foram realizados testes não paramétricos. Desse modo foi realizado o teste de Friedman para analisar as diferenças entre os tempos de armazenamento para cada tratamento, seguido do teste de Wilcoxon para a avaliação dos contrastes. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar as diferenças entre os tratamentos/produtos em um mesmo período de armazenamento, seguido do teste de Mann-Whitney U para a avaliação dos contrastes. Para as análises foi utilizado o software *Statistica* versão 8.0 (Statitica Inc., Tulsa, OK, EUA), sendo considerado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade da cultura *starter* nas bebidas lácteas

A viabilidade de *S. thermophilus* (cultura *starter*) para os tratamentos de bebida láctea B1 a B3 é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação entre a viabilidade de *Streptococcus thermophilus* nos diferentes tratamentos de bebida láctea B1, B2 e B3.

Tempo de armazenamento (dias)	<i>S. thermophilus</i> (log UFC/g)		
	Bebida láctea		
	B1	B2	B3
1	9,27 ± 0,20 ^{Ac}	9,10 ± 0,18 ^{Ab}	9,45 ± 0,52 ^{Ab}
7	8,99 ± 0,06 ^{Ab}	8,95 ± 0,11 ^{Aa}	8,98 ± 0,18 ^{Aa}
14	8,94 ± 0,16 ^{Aab}	8,89 ± 0,11 ^{Aa}	8,94 ± 0,20 ^{Aa}
21	8,90 ± 0,05 ^{Aba}	8,89 ± 0,03 ^{Aa}	8,98 ± 0,20 ^{Ba}

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os produtos para um mesmo período de amostragem.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os diferentes períodos de amostragem um mesmo período de amostragem.

B1 = bebida láctea controle contendo *S. thermophilus* TA40; B2 = bebida láctea potencialmente probiótica tradicional contendo *S. thermophilus* TA40 e a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32; B3 = bebida láctea potencialmente probiótica produzida com *S. thermophilus* TA40 e a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 003.

A partir dos resultados da Tabela 1 percebe-se que do 1º ao 14º dia de armazenamento as populações de *S. thermophilus* mostraram-se muito semelhantes para os três tratamentos, não havendo, portanto, diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos no período estudado. No entanto, aos 21 dias de armazenamento, as populações da cultura *starter* se mostraram mais viáveis, do ponto de vista estatístico, em B3 ($p < 0,05$), contudo, trata-se de uma diferença muito pequena, menos de 0,1 ciclo log, irrelevante em termos microbiológicos. Os três tratamentos apresentaram populações de *S. thermophilus* superiores a 9 log UFC no primeiro dia após a fabricação, no entanto, foi observada uma redução significativa da viabilidade desse microrganismo aos 7 dias ($p < 0,05$). Na bebida láctea B3, esta queda foi mais

evidente, passando de 9,45 log UFC/g para 8,98 log UFC/g, redução de, aproximadamente, 0,5 ciclo log. As populações de B1 e B2 obtiveram viabilidade de, respectivamente, 9,27 log UFC/g e 9,10 log UFC/g no 1º dia e de, respectivamente, 8,90 log UFC/g e 8,89 log UFC/g no final do armazenamento. A partir dos 7 dias de armazenamento não foram observadas diferenças significativas na viabilidade de *S. thermophilus* até o fim do período estudado ($p > 0,05$), exceto para a bebida láctea B1, em que houve redução significativa entre 14 e 21 dias ($p < 0,05$).

Uma vez que a população de *S. thermophilus* do tratamento B1 (controle) não diferiu significativamente de B2 e B3, que continham os microrganismos potencialmente probióticos *L. rhamnosus* e *L. plantarum* em cocultura, respectivamente, pode-se afirmar que a presença destas espécies de *Lactobacillus* não influenciou a viabilidade da cultura *starter*.

Populações de *S. thermophilus* semelhantes às encontradas no presente estudo foram obtidas por Buriti e al. (2012) estudando a viabilidade de microrganismos probióticos e teor de fibra alimentar em bebidas lácteas fermentadas caprinas, também produzidas com a cepa TA40, adicionadas de galactomanana parcialmente hidrolisada de *Caesalpinia pulcherrima* (flamboyanzinho), que encontraram viabilidade superior a 9 log UFC/g no primeiro dia de armazenamento, decaindo para cerca de 8,5 log UFC/g ao final de 21 dias. Linhares e Dos Santos (2012) avaliaram a viabilidade de bactérias lácticas em leites fermentados caprinos potencialmente probióticos produzidos com suco de uva e *L. rhamnosus* LR32 e obtiveram populações iniciais de *S. thermophilus* de 9,18 log UFC/g que, apesar de reduzirem aos 28 dias de armazenamento, mantiveram-se superiores a 8 log UFC/g, de modo similar ao observado neste estudo.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas estabelece que a contagem total de bactérias viáveis deve ser de no mínimo 10^6 UFC/g, no produto final, durante o prazo de validade (BRASIL, 2005). Os valores obtidos para as populações de *S. thermophilus* no presente estudo foram suficientes para atender o que preconiza a legislação, uma vez que foram alcançadas populações superiores a 8 log UFC /g, o que corresponde

exponencialmente a 10^8 UFC/g, valores superiores ao mínimo exigido pela legislação.

5.2 Viabilidade da cultura probiótica comercial na bebida láctea e na sobremesa

A evolução durante o período de armazenamento das populações (média + desvio-padrão) de *L. rhamnosus* na bebida láctea fermentada e na sobremesa láctea é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação da viabilidade do microrganismo potencialmente probiótico *Lactobacillus rhamnosus* na bebida láctea B2 e na sobremesa S1.

Tempo de armazenamento (dias)	<i>L. rhamnosus</i> (log UFC/g)	
	Produto	
	Bebida láctea B2	Sobremesa S1
1	7,93 ± 0,10 ^{Bb}	6,89 ± 0,83 ^{Aa}
7	7,99 ± 0,32 ^{Bb}	6,38 ± 0,16 ^{Aa}
14	7,66 ± 0,15 ^{Ba}	6,39 ± 0,15 ^{Aa}
21	7,61 ± 0,12 ^{Ba}	6,34 ± 0,08 ^{Aa}

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os produtos para um mesmo período de amostragem.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os tempos de amostragem para um mesmo produto.

B2 = bebida láctea potencialmente probiótica tradicional contendo *S. thermophilus* TA40 e a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32; S1 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32.

Ao avaliar os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações de *L. rhamnosus* na bebida láctea (B2) quando comparada à sobremesa (S1) em todos os dias de armazenamento. O tratamento B2 obteve populações significativamente superiores do microrganismo probiótico desde o 1^o dia de armazenamento, mantendo essa tendência até o 21^o dia.

A viabilidade de microrganismos probióticos em derivados lácteos é influenciada por fatores como, a cepa utilizada, a presença de cultura *starter*, a interação entre as espécies utilizadas no produto, o tempo de fermentação, as condições de armazenamento e disponibilidade de nutrientes, entre outros (MARQUES, 2012). Neste estudo, a diferença considerável na viabilidade de *L.*

rhamnosus para bebida láctea, quando comparado à sobremesa, se deve, provavelmente, à presença de *S thermophilus* em cocultura no tratamento B2 e à etapa de fermentação. Neste caso, pode ter havido uma associação benéfica entre os microrganismos, que neste estudo seria entre as culturas *starter* e probiótica.

A literatura referencia exemplos de cooperação (associação benéfica) entre as bactérias do iogurte, no qual, durante a fermentação, *S. thermophilus* metaboliza a lactose produzindo ácido láctico, que diminui o pH favorecendo a multiplicação dos lactobacilos (COSTA et al., 2013).

Analisando-se os produtos em separado, observa-se que na bebida láctea, durante todo o armazenamento, foram alcançadas populações superiores a 7 log UFC/g (Tabela 1). No entanto, observa-se que houve uma diminuição significativa na viabilidade de *L rhamnosus* a partir do 14^o dia de armazenamento, mantendo-se constante até o 21^o dia. Linhares e Santos (2012), em estudo que avaliou a viabilidade de bactérias lácticas em leite fermentado caprino sabor uva, encontraram populações similares de *L. rhamnosus* LR32. Em tal estudo as populações alcançaram 7,58 log UFC/g ao final de 28 dias de armazenamento. Viabilidade ligeiramente mais elevada (aproximadamente 8 log UFC/mL) para a mesma cepa foi relatada em bebidas lácteas por Buriti et al. (2014). No que se refere à sobremesa láctea, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as populações de *L. rhamnosus* ao longo do armazenamento. Neste produto, foram alcançadas populações de *L. rhamnosus* superiores a 6 log UFC/g no 21^o dia de armazenamento. Populações semelhantes foram observadas para cepas de *L. acidophilus* por Vieira (2011), em sobremesa láctea simbiótica contendo amido resistente e gomas, e por Buriti et al. (2010), em mousse de goiaba simbiótico.

5.3 Viabilidade das cultura nativas potencialmente probióticas na bebida láctea e na sobremesa

Em muitos países as indústrias de laticínios adquirem culturas probióticas e *starter* de empresas multinacionais que se dedicam a desenvolver

ou produzir cultivos microbianos VAZQUEZ et al., 2007). Contudo, as propriedades funcionais de probióticos desenvolvidos a partir de populações e condições ambientais muito diferentes podem não ser facilmente extrapoladas para a população nacional, fazendo-se necessário o desenvolvimento de cepas probióticas próprias. Desse modo, com a obtenção de probióticos autóctones, isto é, próprios de uma região, poderão ser desenvolvidos alimentos funcionais mais eficazes e adaptados às condições da população nacional, além de aumentar a competitividade e o crescimento tecnológico para a indústria, bem como aumentar a oferta de probióticos a um preço mais acessível para o consumidor (JIMENÉZ, 2012).

Nesse sentido, assim como este trabalho com produtos lácteos, outros diversos estudos têm sido desenvolvidos, em matrizes lácteas e não-lácteas, com o objetivo de avaliar a viabilidade de bactérias nativas com potencial probiótico.

Na Tabela 3 é apresentada a comparação da viabilidade de *L. rhamnosus* com *L. plantarum* nas bebidas lácteas fermentadas ao longo do armazenamento.

Tabela 3 – Comparação da viabilidade dos microrganismos potencialmente probióticos nas bebidas lácteas fermentadas B2 e B3.

Tempo de armazenamento (dias)	<i>Lactobacillus</i> sp. (log UFC/g)	
	Bebidas lácteas	
	B2	B3
1	7,93 ± 0,10 ^{Bb}	7,39 ± 0,59 ^{Ac}
7	7,99 ± 0,32 ^{Bb}	7,24 ± 0,53 ^{Ac}
14	7,66 ± 0,15 ^{Ba}	7,00 ± 0,41 ^{Ab}
21	7,61 ± 0,12 ^{Ba}	6,94 ± 0,42 ^{Aa}

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os produtos para um mesmo período de amostragem

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os diferentes períodos de amostragem para um mesmo produto.

B2 = bebida láctea potencialmente probiótica tradicional contendo *S. thermophilus* TA40 e a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32; B3 = bebida láctea potencialmente probiótica produzida com *S. thermophilus* TA40 e a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 003.

As populações de *L. rhamnosus* mostraram-se significativamente superiores ($p < 0,05$) às de *L. plantarum* durante todo período de armazenamento. Em ambos os produtos, as populações de microrganismos foram superiores a 7 log UFC no 1º dia de armazenamento, apresentando discreta, porém, significativa diminuição ($p < 0,05$) em suas populações a partir do 14º dia de armazenamento. Ao final de 21 dias foram observadas populações de 7,61 log UFC/g para *L. rhamnosus* e de 6,94 log UFC/g para *L. plantarum*.

A queda na viabilidade do microrganismo em relação ao primeiro dia, é esperada uma vez que ao aproximar o prazo de validade do produto, o aporte de nutrientes diminui, refletindo em uma queda na viabilidade.

Populações superiores às encontradas no presente estudo foram observadas por Jiménez (2012) ao avaliar a viabilidade de uma cepa nativa de *L. plantarum* em sucos de frutas. Naquele estudo, ao final de 30 dias de armazenamento as populações de *L. plantarum* foram superiores a 8 log UFC/g.

A viabilidade das cepas de *Lactobacillus* sp para as sobremesas lácteas ao longo do armazenamento é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparação da viabilidade dos microrganismos potencialmente probióticos nas sobremesa lácteas S1, S2 e S3.

Tempo de armazenamento (dias)	<i>Lactobacillus</i> sp. (log UFC/g)		
	Sobremesa		
	S1	S2	S3
1	6,89 ± 0,83 ^{ACa}	6,79 ± 0,20 ^{BCa}	6,41 ± 0,19 ^{Aa}
7	6,38 ± 0,16 ^{Aa}	6,64 ± 0,20 ^{ABa}	6,48 ± 0,07 ^{ABa}
14	6,39 ± 0,15 ^{Aa}	6,68 ± 0,13 ^{Ba}	6,42 ± 0,08 ^{Aa}
21	6,34 ± 0,08 ^{Aa}	6,61 ± 0,12 ^{Ba}	6,34 ± 0,19 ^{Aa}

^{A,B,C} Letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os produtos para um mesmo período de amostragem

^a Letras minúsculas sobrescritas iguais não diferem significativamente entre os tempos de amostragem para um mesmo produto.

S1 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32; S2 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura nativa *L. mucosae* CNPC 007; S3 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 020.

De acordo com a avaliação dos dados de *Lactobacillus* sp. da Tabela 4, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as sobremesas S1 e S3 ao longo do armazenamento. No entanto, comparando-se S1 com S2 percebe-se que a partir do 14^o dia as populações de *Lactobacillus* sp. foram significativamente superiores ($p<0,05$) em S2, produzida *L. mucosae* CNPC 007. A viabilidade de probióticos em S2 também foi significativamente superior se comparada à S3, produzida com *L. plantarum* CNPC 020, em todo período de armazenamento, com exceção do 7^o dia. Avaliando-se o período de armazenamento para cada tratamento, observa-se que as populações de *Lactobacillus* sp, mantiveram-se constantes, sem diferenças significativas ($p>0,05$), em S1, S2 e S3 do 1^o ao 21^o dia. Desse modo, observa-se que houve uma melhor viabilidade da cultura nativa de *L. mucosae*, tanto em relação à cultura nativa de *L. plantarum*, quanto à cepa comercial de *L. rhamnosus* LR32.

Uma melhor viabilidade de cultura nativa em relação à cepa de referência foi observada por Marín, Cortéz e Montoya, (2009) ao estudarem a cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 e a cepa *Lactobacillus casei* ATCC 393 em polpa de *uchuva* (*Physalis angulata*) e em solução isotônica de glicose. Em tal estudo a viabilidade da cepa nativa de *L. plantarum* foi superior à da cepa ATCC, obtendo populações acima de 9 log UFC/g tanto na polpa de fruta quanto na solução isotônica de glicose, ao passo que para a cepa ATCC foram observadas populações superiores a 8 log UFC/g nas mesmas matrizes em um período de 15 dias de armazenamento.

A viabilidade de *L. mucosae* CNPC 007 foi avaliada previamente por Moraes et al. (2015) em queijo de cabra tipo coalho. Em tal estudo foram observadas populações superiores a 8 log UFC/g ao final de 28 dias de armazenamento.

A comparação da viabilidade das cepas nativas de *Lactobacillus* sp. para a bebida láctea e as sobremesa lácteas são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação da viabilidade das cepas nativas potencialmente probióticas de *Lactobacillus* sp. na bebida láctea e nas sobremesas lácteas.

Tempo de armazenamento (dias)	<i>Lactobacillus</i> sp. (log UFC/g)		
	Produtos		
	Bebida láctea B3	Sobremesa S2	Sobremesa S3
1	7,39 ± 0,59 ^{Bc}	6,79 ± 0,20 ^{Ba}	6,41 ± 0,19 ^{Aa}
7	7,24 ± 0,53 ^{Bc}	6,64 ± 0,20 ^{Aa}	6,48 ± 0,07 ^{Aa}
14	7,01 ± 0,41 ^{Bb}	6,68 ± 0,13 ^{Ba}	6,42 ± 0,08 ^{Aa}
21	6,94 ± 0,43 ^{Ba}	6,61 ± 0,12 ^{Ba}	6,34 ± 0,19 ^{Aa}

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os produtos para um mesmo período de amostragem

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas entre os diferentes períodos de amostragem para um mesmo produto.

B3 = bebida láctea potencialmente probiótica contendo *S. thermophilus* TA40 e a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 003; S2 = sobremesa potencialmente probiótica produzida a cultura nativa *L. mucosae* CNPC 007; S3 = sobremesa potencialmente probiótica produzida a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 020.

A cepa de *L. plantarum* CNPC003 na bebida láctea B3 mostrou viabilidade significativamente superior à cepa *L. plantarum* CNPC020 na sobremesa S3 em todos os dias do armazenamento ($p < 0,05$), porém não apresentou diferença significativa em relação à cepa *L. mucosae* CNPC007 em S2 no mesmo período, com exceção do 7^o dia no qual as populações de *L. plantarum* CNPC003 foram significativamente ($p < 0,05$) superiores às de *L. mucosae*.

Para que acarretem benefícios à saúde do consumidor, os probióticos devem ser ingeridos em quantidades adequadas. Segundo Gallina et al. (2012) vários autores propõem que a dose mínima diária de probióticos considerada efetiva para a obtenção de benefícios à saúde seja de 10^8 e 10^9 UFC (8 a 9 log UFC), o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (6 a 7 log UFC/g).

Portanto, de acordo com os dados obtidos neste estudo, as populações de *Lactobacillus* sp. na a bebida láctea e na sobremesa láctea mantiveram-se, por 21 dias de armazenamento, dentro dos níveis recomendados pela literatura para o consumo de probióticos, visto que o consumo diária de 100 g do produto garantiria a ingestão de 10^8 - 10^9 UFC de probióticos.

5.4 Análise de microrganismos contaminantes

Na tabela 6 são apresentadas as populações de bolores e leveduras, coliformes a 35°C e coliformes a 45°C nas bebidas lácteas

Tabela 6 - Populações de microrganismos contaminantes detectadas nas bebidas lácteas B1, B2 e B3.

Parâmetro	Tempo(dias)	B1	B2	B3
Bolores e leveduras (log UFC/g)	1	<100–100	<100-100	<100-300
	7	<100– 2000	<100-5000	<100-2000
	14	<100 –2000	<100- 4000	<100-1000
	21	<100 – 100	<100-1000	< 100-1000
	% amostras positivas (n.º amostras positivas/ n.º total de amostras × 100)	33 (16/48)	31 (15/48)	31 (15/48)
Coliformes a 35°C (NMP/g)	1	<3	<3-3	<3-3
	7	n.a	<3	<3
	14	n.a	<3	<3
	21	n.a	<3	<3
	% amostras positivas (n.º amostras positivas/ n.º total de amostras × 100)	0 (0/27)	0,02% (0/54)	0,02% (0/54)
Coliformes a 45°C (NMP/g)	1	n.a.	<3	<3
	7	n.a.	n.a.	n.a.
	14	n.a.	n.a.	n.a.
	21	n.a.	n.a.	n.a.
	% amostras positivas (n.º amostras positivas/ n.º total de amostras × 100)	0 (0/0)	0 (0/9)	0 (0/9)

B1 = bebida láctea controle contendo *S. thermophilus* TA40; B2 = bebida láctea potencialmente probiótica tradicional contendo *S. thermophilus* TA40 e a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32; B3 = bebida láctea potencialmente probiótica produzida com *S. thermophilus* TA40 e a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 003.

n.a. = não analisado.

Houve a presença de bolores e leveduras nas bebidas lácteas B1, B2 e B3, em todo período de armazenamento. Para os três produtos as populações deste contaminante foram mais expressivas a partir do 7^o dia, com redução no 21^o dia para os três tratamentos, sendo essa redução mais expressiva no tratamento B1. Apesar disso, ao final de 21 dias B1 apresentou a maior porcentagem de amostras contaminadas (33%), enquanto que B2 e B3 apresentaram 31%. Estas análises foram realizadas como parâmetro complementar para avaliar a qualidade higiênico sanitária dos produtos, uma vez que a legislação brasileira não exige a pesquisa de bolores e leveduras em bebidas lácteas fermentadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001; BRASIL, 2005).

Por sua vez, de acordo com a legislação nacional vigente (BRASIL, 2005) as bebidas lácteas fermentadas podem conter, no máximo, 100 NMP/g ou mL de coliformes a 35 °C e 10 NMP/g ou mL de coliformes a 45 °C. No presente estudo, uma amostra do tratamento B1 e uma do tratamento B2, ambas no 1^o dia de armazenamento apresentaram 3 NMP de coliformes a 45 °C, números muito abaixo dos valores permitidos pela legislação para este parâmetro. Para coliformes a 35 °C, as populações para estes contaminantes foram inferiores ao limite de detecção do método utilizado, que é de 3 NMP/g ou mL. Desse modo, os três tratamentos analisados estão de acordo com a literatura no que se refere a estes parâmetros.

As populações de bolores e leveduras, coliformes a 35 °C e *Staphylococcus* coagulase positiva para a sobremesa láctea são exibidas na Tabela 7.

Tabela 7 – Populações de microrganismos contaminantes detectadas na sobremesa láctea durante 21 dias de armazenamento

Parâmetro	Tempo (dias)	S1	S2	S3
Bolores e leveduras (UFC/g)	1	<100 – 200	<100- 100	<100- 100
	7	<100 – 2000	<100- 2000	<100- 100
	14	<100 – 1000	<100- 3000	<100-3000
	21	<100 – 15000	<100-16000	< 100-8000
	% amostras positivas (n.º amostras positivas/ n.º total de amostras × 100)	35 (17/48)	27 (13/48)	25 (12/48)
Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g)	1	<100- 300	<100-2000	<100-2000
	7	< 100-100	<100-100	<100-200
	14	<100- 200	<100-200	<100-<1000
	21	<100- 200	<100- 100	<100-200
	% amostras positivas (n.º amostras positivas/ n.º total de amostras × 100)	16 (8/48)	21 (10/48)	12 (6/48)
Coliformes a 35°C (NMP/g)	1	<3	<3	<3
	7	n.a.	n.a.	n.a.
	14	n.a.	n.a.	n.a.
	21	n.a.	n.a.	n.a.
	% amostras positivas (n.º amostras positivas/ n.º total de amostras × 100)	0 (0/27)	0 (0/27)	0 (0/27)

S1 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura comercial *L. rhamnosus* LR32; S2 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura nativa *L. mucosae* CNPC 007; S3 = sobremesa láctea potencialmente probiótica contendo a cultura nativa *L. plantarum* CNPC 020.
n.a. = não analisado.

Foram detectados bolores e leveduras para as sobremesas S1, S2 e S3 durante os 21 dias que compreenderam o armazenamento do produto. Observa-se que as populações de bolores e leveduras foram mais acentuadas a partir do 7^o dia de armazenamento para S1 e S2 e a partir do 14^o dia para S3. O tratamento S1 mostrou maior porcentagem de amostras contaminadas (35%), ao passo que S2 e S3 apresentaram 27% e 25% de contaminação, respectivamente. Em comparação com a bebida láctea (Tabela 7), nota-se que, apesar de, em ambos os produtos terem sido detectados bolores e leveduras, em todo o período de armazenamento, as populações destes microrganismos foram mais expressivas na sobremesa. Isso se deveu, provavelmente à presença da cultura de *Streptococcus thermophilus* nas bebidas lácteas, o que teria levado a uma competição por nutrientes, entre os microrganismos presentes na formulação, resultando em populações inferiores de bolores e leveduras na bebida láctea. Populações de até 1×10^5 UFC/ mL foram relatadas por Santos et al. (2012) em estudo que avaliou a qualidade higiênico sanitária de polpa de frutas.

Do mesmo modo que apresentado para as bebidas lácteas fermentadas, estas análises foram realizadas como parâmetro complementar para avaliar a qualidade higiênico sanitária das sobremesas, uma vez que legislação brasileira não exige a pesquisa de bolores e leveduras nesses produtos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). Contudo, segundo Santos et al. (2012) bolores e leveduras são contaminantes comuns em alimentos, possuindo, grande capacidade de causar deterioração, ocasionando alterações organolépticas e redução do tempo de prateleira do produto. Desse modo, a análises destes microrganismos são importantes para avaliar as condições higiênico-sanitárias de alimentos.

Por sua vez, no que refere às análises para *Staphylococcus coagulase* positiva, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece que as populações desse microrganismo em sobremesas lácteas refrigeradas devem ser de, no máximo, 5×10^2 UFC/g. No presente trabalho, uma amostra de cada um dos tratamentos S2 e S3, ambas no 1^o dia de armazenamento, obtiveram populações de 2×10^3 UFC/g, acima, portanto, do limite que estabelecido pela legislação.

Concomitantemente, de acordo com os resultados obtidos para coliformes 35°C, no 1º dia de armazenamento, as populações destes contaminantes estiveram abaixo do limite de detecção do método utilizado que é de 3 NMP. Visto que, o método não detectou coliformes a 35°C, não foram realizadas as provas para coliformes a 45°C. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece que a população máxima de coliformes a 45°C que podem estar presentes em sobremesas lácteas é de 5 NMP/g ou mL. Os produtos analisados estão, portanto, de acordo com a legislação no que refere a este parâmetro.

É sabido que muitas bactérias lácticas possuem a capacidade de inibir microrganismos contaminantes e deteriorantes por criarem um ambiente hostil para estes microrganismos através da produção de substâncias antimicrobianas como, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de via metabólica (ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio) e bacteriocinas (PEREIRA; GOMEZ, 2007). No entanto, no presente trabalho, a presença de bactérias probióticas nos produtos analisados não foi suficiente para inibir a contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva. Resultados semelhantes foram obtidos por Prezzi (2014) em estudo que investigou o efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* GG em queijos minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Naquele estudo a presença de *L. rhamnosus* inibiu *L. monocytogenes* mas não exerceu efeito inibitório sobre *S. aureus*.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC nº12 de janeiro de 2001 ainda estabelece que, para bebidas lácteas fermentadas e sobremesas sejam realizadas a análise de *Salmonella* sp., assim como *Bacillus cereus* unicamente para sobremesas. Estas análises estão previstas nos estudos complementares a este trabalho, envolvendo a análise sensorial dos produtos, a qual será conduzida por este grupo de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que as bebidas lácteas fermentadas e as sobremesas lácteas produzidas constituem-se como bons veículos para microrganismos probióticos, uma vez que conseguiram manter por todo período de armazenamento, para todas as cepas estudadas, populações superiores às recomendadas pela literatura para que possam resultar em benefícios à saúde do consumidor.

A cepa comercial de *L. rhamnosus* LR32 mostrou melhor viabilidade na bebida láctea, quando comparada à sobremesa. Na bebida láctea, a cepa comercial de *L. rhamnosus* LR32 mostrou maior viabilidade que a cepa nativa de *L. plantarum* CNPC 003; entretanto, conforme mencionado anteriormente, a bebida produzida com a cepa nativa atenderia aos requisitos exigidos para um alimento probiótico. As populações da cultura *starter* de *S. thermophilus* estiveram de acordo com o exigido pela legislação nas bebidas lácteas.

Nas sobremesas, por sua vez, a cepa nativa de *L. mucosae* CNPC 007 mostrou viabilidade superior à cepa comercial de *L. rhamnosus* LR32, enquanto que a cepa de *L. plantarum* CNPC 020 apresentou viabilidade similar à cepa comercial.

Em relação aos contaminantes, a bebida láctea e a sobremesa láctea apresentaram boa qualidade higiênico-sanitária no que se refere aos parâmetros de coliformes a 35 °C e a 45 °C.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 672–678, 2009.
- ALMEIDA, P. L.; LIMA, S. N.; COSTA, L. L.; OLIVEIRA, C.C.; DAMASCENO, K. B.; SANTOS, B. A.; CAMPAGNOL, P.C. B. Effect of jaboticaba peel extract on lipid oxidation, microbial stability and sensory properties of Bologna-type sausages during refrigerated storage. **Meat Science**, v.10, n.1, p. 9-14, 2015.
- ALVES, A. P. C. **Casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell) Berg): Processo de secagem e uso como aditivo em iogurte**. 90 f. 2011, Dissertação (Mestrado em Agroquímica) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 145-15, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Alegações de propriedade funcional e de saúde. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wwr>>. Acesso em 18 de maio de 2016.
- . Resolução n. 18 de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua embalagem. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 231, 03 dez. 1999. Seção 1, p. 23- 24.
- . Resolução RDC ANVISA/MS n.12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 7, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 46-53.
- ARES, F.; ARRARTE, E.; LEON, T.; ARES, G.; GAMBARO, A. Development of functional milk desserts enriched with resistant starch based on consumers' perception. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 5, p. 465–475, 2012
- BALDISSERA, A. C.; BETTA, F. D.; LINDNER, D. D.; PENNA, A. L. B. Functional Foods: a new frontier for developing whey based protein beverages. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.16, 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da União**, n.163, 24 ago. 2005. Seção 1, p.7-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62 de 27 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, n.181, 18 set. 2003. Seção 1, p.14-51.

BURITI, F. C. A.; FREITAS, S .C.; EGITO, A. S.; SANTOS, K. M. O. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. **LWT – Food Science and Technology**, v59, n. 1, p. 196-203, 2014.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A; SAAD, S. M. I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. **Food Chemistry**,123, n.4, p.1190-1197. 2010.

BURITI, F.C.A.; FREITAS, S.C.; DOS SANTOS, K. M.O. Viabilidade de microrganismos probióticos e teor de fibra alimentar em bebidas lácteas fermentadas caprinas adicionadas de galactomanana parcialmente hidrolisada de *Caesalpinia pulcherrima* (flamboyanzinho). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 22.; CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO, 3., 2012 . Recife. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, v.4, n.6, 2012.

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

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B. P. M.; CRUZ, A. G.; CONTE, C. A. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1387- 1408, 2013.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Physico-chemical, microbiological and rheological evaluation of dairy beverage and fermented milk added of probiotics. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

EGITO, A. S. do; SANTOS, K. M. O.; BENEVIDES, S.D.; BURITI, F. C.A.; LAGUNA, L. E. **Processamento artesanal de queijo fabricado com leite de cabra utilizando coagulação láctica**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 6 p. (Comunicado Técnico, 99).

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Córdoba, Argentina, 2001.

FERREIRA, A. E.; FERREIRA, B. S.; LAGES, M. M. B.; RODRIGUES, V. A. F.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D, Produção, caracterização e utilização da farinha de casca de jaboticaba em biscoitos tipo cookie. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.

FLORENTINO, E.R. **Produção de “ Queijo coalho” com leite pasteurizado.** Campina Grande, 1997, p.30.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 284–292, 2013.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C., AZAMBUJA-FERREIRA, N.C. MENDONÇA, J.B. NORBONA, R. A., Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012

GALLINA, D. A.; ALVES, A.T.S.; TRENTO, F.K.H.S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.4, p. 239-244, 2011.

JIMENÉZ, J.A.S. **Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico.** 2012. 127 f. Disertación (Maestría en Diseño y Gestión de Procesos en Énfasis en Bioprocesos)—Universidad de la Sabana, Chía, 2012.

KEGELE, F. C. O., DUARTE, R. S., MIGOWSKY, E. *Saccharomyces boulardii*: novas perspectivas para a terapêutica em diarreia aguda. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67. n.12, p. 32-37, 2010.

LAMOUNIER, M. L.; ANDRADE, F. C.; MENDONÇA, C. D.; MAGALHÃES, M. L. Development and characterization of ice cream enriched with different formulations flour jaboticaba bark (*Myrciaria cauliflora*). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 93-104, 2015.

LIMA, J.R; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, R. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência & Saúde**, v.7, n.1, p.27-34, 2014.

LINHARES, J. M. R.; DO SANTOS, K. M. O. Viabilidade de bactérias lácticas em leite fermentado caprino sabor uva. In: I ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. 1, 2012, Sobral. Resumos...Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2012. p.17-18. (Documento, 104).

MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A.F.; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e a viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p.935-942, 2008.

MARIN, A. Z. T.; CORTEZ, R. MISAEL, MONTOYA, C. I.O. Evaluación de la viabilidade de crecimiento de la cepa nativa de *Lactobacillus plantarum* IPBM10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393 em pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa. **Vitae, Revista de Facultad de Química Farmacéutica**, v. 16, n.2, p. 210-207, 2009.

MARQUES, A. P. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro lácteo e café solúvel com atividade probiótica**. 107 f., 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)—Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MARQUES, T.R. **Aproveitamento tecnológico de resíduos da acerola: farinhas e barras de cereais**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)— Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MARQUETTI, C. **Obtenção e caracterização de farinha de casca de jabuticaba (*Plinia cauliflora*) para adição em biscoito tipo cookie**. 2014. 117 f. Dissertação Mestrado em Tecnologia dos Alimentos)—Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M.I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 1, p. 1993-2015, 2015.

MENEZES, A.C.S.; **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro de leite e polpa de cajá (*Spondias mombin* L.) com potencial atividade probiótica**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)—Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

MORAES G. M. D.; SANTOS K. M.O.D.; BARCELOS S.C.; LOPES S. A. EGITO A. S. Viabilidade da cepa *L. mucosae* potencialmente probiótica em queijo de cabra tipo coalho. In: XIX ENCONTRO NACIONAL E V CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 5, 2015, Natal. **Anais...** LACEN-RN: SESAP: UFRN, 2015. 5 f.

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

PALANCA, V.; RODRÍGUEZ, E.; SEÑORÁNS. J; REGLERO, G. Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, n. 2, p.199-202, 2006.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

POPPI, F. A.; COSTAB, M. R.; DE RENSISC, C. M. B.; SIVIERI, K. Soro de Leite e Suas Proteínas: Composição e Atividade Funcional. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, n.12, v. 2, p. 31-7, 2010.

PREZZI, L.E. **Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes***. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos)–Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n. 11, p. 2493-2502, 2007.

———.Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v.93, n. 1, p.S13-S25, 2005.

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

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURITI, F.C.A. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: **Probióticos e prebióticos em Alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2011, p.23-50.

SANTOS, L. A.; BARBOSA, A. O.; NUNES, A. K. N.BARRETO, T. ; FREITAS, F. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de polpas de frutas comercializadas em uma cidade do recôncavo da Bahia .In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 22.; CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO, 3., 2012 . Recife. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, v. 4, n. 6, 2012.

SIQUEIRA, A. M. O.; MACHADO, E. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1693-1700, 2013.

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

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v.9, n.1, p. 225-241, 2014.

WU, S.; LONG.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148-159, 2013.

VALENCIA, M. S. **Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81**. 69 f. 2015, Dissertação (Mestrado em Nutrição)– Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBEC, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**. v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VÁZQUEZ, S.; LOPRETTI, M.; REY, F.; ZUNINO, P. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. para su uso como probióticos en la industria láctea. **Publicacion Anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay**, n. 2, p. 12-14, 2007.

VIDIGAL, M. C. T. R.; RAMOS, A. M.; MINIM, V. P. R. BERGER, E. C.; MINIM, L. A. Concentrado proteico do soro melhora a qualidade sensorial de sobremesa láctea diet. **Ciência Rural**, v. 1, n. 1, p. 1- 8, 2012.

VIEIRA, T.A. **Desenvolvimento de uma sobremesa simbiótica**. 90 f, 2011, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) –Instituto Mauá de tecnologia, São Caetano do Sul, 2011.

VIEIRA, A. D.S.; DOS SANTOS, K.M.O., BARCELOS, S. C., OLIVEIRA, I. C., SAAD, S. M. I. **Processamento artesanal de queijo caprino simbiótico tipo *petit-suisse***. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014. 6 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 141).

ZICKER, M. C. **Obtenção e utilização do extrato aquoso de jaboticaba (*myrciaria jaboticaba* (vell) berg) em leite fermentado: caracterização físico-química e sensorial**. 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) –Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.