



UEPB

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

**LAYSE FERREIRA DE BRITO**

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE BIFIDOBACTÉRIAS EM MEIO CONTENDO  
HIDROLISADO PROTEICO DE SORO DE LEITE**

**CAMPINA GRANDE  
2016**

LAYSE FERREIRA DE BRITO

AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE BIFIDOBACTÉRIAS EM MEIO CONTENDO  
HIDROLISADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba em cumprimento à exigência para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia 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.

B862a Brito, Layse Ferreira de.  
Avaliação da multiplicação de bifidobactérias em meio contendo hidrolisado proteico de soro de leite [manuscrito] / Layse Ferreira de Brito. - 2016.  
36 p.  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (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. Bifidobactérias. 2. Probióticos. 3. Hidrolisado proteico.  
4. Soro de leite. I. Título.

21. ed. CDD 615.329

LAYSE FERREIRA DE BRITO

AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE BIFIDOBACTÉRIAS EM MEIO CONTENDO  
HIDROLISADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Departamento de Farmácia da Universidade  
Estadual da Paraíba em cumprimento à  
exigência para a obtenção do grau de Bacharel  
em Farmácia.

Aprovada em 14/10 /2016.

Flávia Carolina Alonso Butiti  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Carolina Alonso Butiti/ UEPB  
Orientadora

Karlete Vânia Mendes Vieira  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karlete Vânia Mendes Vieira/ UEPB  
Examinadora

Michelangeba Sueffeny de Caldas Nobre  
Prof.<sup>a</sup> Msc. Michelangeba Sueffeny de Caldas Nobre/ FIP  
Examinadora

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Aquele que tudo pode, que esteve/está/estará comigo sempre, horando minha fé.

À minha orientadora Flávia Carolina, que foi tão solícita desde do momento que a procurei para iniciar no projeto que se tornou meu TCC até sua fase final. Sua competência e dedicação me fez torná-la, um exemplo de profissional a ser seguido. Meu muito obrigada.

Ao pessoal do NUPEA que me recepcionou tão bem, principalmente aos técnicos do laboratório Michelangela, Aline e Thiago que me auxiliaram no que puderam sempre preocupados com o andamento dos meus experimentos.

À Joyce Correia pela grandiosa ajuda na realização dos experimentos, desdobrando-se para me auxiliar sempre que seu horário corrido permitia.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ) e a Fundação André Tosello por terem fornecido parte dos materiais utilizados neste estudo.

À minha família, que desde sempre acreditou em meu potencial. Tornando-se alavanca pra alçar voos cada vez mais altos. Vibraram com minha aprovação no vestibular e hoje realizam junto comigo a realização desse sonho. Obrigada por toda e qualquer forma de demonstração de amor, é totalmente recíproco.

Aos demais, não vou me deter a nomes, não quero cometer a insolência de esquecer algum, pois louvo a Deus pela gama de amigos que possuo. Mas tenho certeza que interiormente, cada um sabe a sua significância não só durante essa minha jornada acadêmica, mas em minha vida no geral, aos que ouviram e compartilharam lamentos, que me acalmaram e que me impulsionaram a não desistir, a tentar mais uma vez e que, no final de tudo sempre acabava em boas gargalhadas e fortes abraços pelo êxito alcançado, pelos conselhos e momentos ímpares compartilhados. Tornando minha vida mais leve, doce. Fazendo-me sentir uma pessoa agraciada e amada.

Aos meus pais, pela dedicação,  
companheirismo e amizade, DEDICO

## RESUMO

Uma das causas da disbiose intestinal é devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Um maior uso de microrganismos probióticos em alimentos torna-se atrativo para que ocorra uma recuperação mais rápida da microbiota intestinal, prevenindo o aparecimento de doenças oportunistas. Dessa forma, é visto como algo interessante e necessário a ampliação da variedade de alimentos contendo tais microrganismos, bem como o estudo de ingredientes que estimulem a viabilidade dos probióticos nos produtos. O hidrolisado proteico de soro de leite é um ingrediente que poderia auxiliar a multiplicação de bifidobactérias em alimentos. Neste estudo, foi analisada a viabilidade de três cepas de bifidobactérias (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium bifidum* CCT7603 e *Bifidobacterium longum* BLG301) em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) com cisteína na presença de diferentes concentrações de hidrolisado proteico de soro de leite (0 mg/ml, 0,0125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml e 1 mg/ml), incubado em condições de anaerobiose por 24 h a 37°C. Posteriormente foi efetuado o plaqueamento em profundidade das diluições decimais seriadas dos microrganismos nos caldos (método de *pour plate*) em ágar MRS com cisteína e incubação em condições de anaerobiose a 37°C por 72 h para a contagem de colônias nas placas. Foram efetuadas análises estatísticas para as comparações do comportamento das bactérias na presença do hidrolisado proteico de soro de leite e a avaliação de seu metabolismo. Apesar do hidrolisado proteico, independentemente da sua concentração utilizada, não ter resultado em diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na viabilidade das bifidobactérias estudadas, observou-se que a cepa *B. bifidum* CCT7603 obteve o resultado mais promissor dentre os três microrganismos analisados, apresentando a maior multiplicação na presença daquele ingrediente, particularmente na concentração de 0,5 mg/ml, em comparação às demais. Considerando a possibilidade de uso de uma cultura de bifidobactérias em um produto contendo hidrolisado proteico, entre aquelas avaliadas no presente estudo, seria, portanto, escolhida a cepa *B. bifidum* CCT7603.

Palavras-Chave: Bifidobactérias. Probióticos. Hidrolisado proteico de soro. Multiplicação microbiana.

## ABSTRACT

One of the reasons of intestinal dysbiosis is due to the indiscriminate use of antibiotics. A higher use of probiotic microorganisms in foods becomes attractive to recover fast the intestinal microbiota, preventing the appearance of opportunistic diseases. In this manner, the increase of the variety of food with probiotic microorganisms is seen as something interesting and necessary, as well as the study of ingredients that promote the viability of probiotics in products. The whey protein hydrolyzate is an ingredient that might improve the growth of bifidobacteria in food products. In this study, it was assessed the viability of three strains of bifidobacteria (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, *Bifidobacterium bifidum* CCT7603 and *Bifidobacterium longum* BLG301) in de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth with cysteine in the presence of different concentrations of whey protein hydrolyzate (0 mg/ml, 0.0125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml and 1 mg/ml), incubated in anaerobic conditions for 24 h at 37°C . After this period, the decimal dilutions of the broth with microorganisms were pour plated in MRS agar with cysteine and incubated in anaerobic conditions at 37 °C for 72 h for counting of colonies on agar plates. The statistical analysis was performed for comparing the bacterial behavior in the presence of the whey protein hydrolyzate and evaluation of their metabolism. Despite the whey protein hydrolysate at any concentration used in the assays did not result in significant differences ( $p>0.05$ ) concerning the viability of bifidobacteria studied, the strain *B. bifidum* CCT7603 had the most promising result between the three microorganisms analyzed, achieving the highest growth promotion in the presence of that ingredient, particularly in the concentration of 0.5 mg/ml, when compared with the other strains. In view of a possible use of a culture of bifidobacteria in a food product processed with whey protein hydrolyzate, among those evaluated in this study, therefore, it would be chosen the strain *B. bifidum* CCT7603.

Keywords: Bifidobacteria. Probiotics. Whey protein hydrolyzate. Microbial growth.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	8
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	12
2.1	Probióticos.....	12
2.2	Hidrolisado proteico de soro de leite.....	16
2.3	Bifidobactérias.....	17
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	<b>METODOLOGIA .....</b>	21
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	25
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	28
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	29

## 1 INTRODUÇÃO

O equilíbrio e um bom funcionamento da microbiota intestinal leva à homeostase das funções biológicas do indivíduo, resultando em uma vida com mais qualidade (SAAD, 2006; STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008).

A microbiota intestinal é vasta e é composta de um grande número de bactérias anaeróbias como *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Ruminococcus* (FORSYTHE, 2002).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal irão variar de população com o passar da vida do hospedeiro, colonizando e garantindo a estabilidade da microbiota intestinal, sendo passível de mudanças frente a fatores como tratamento com antibióticos, características genéticas e imunológicas do hospedeiro, modo de nascimento, idade, composição da dieta aleitamento materno ou não, que podem, assim, desequilibrar a microbiota. A formação da microbiota do trato gastrointestinal, portanto, ocorre por simultaneidade das interações destes fatores que podem um influenciar no efeito do outro, interações essas que resultam em efeitos locais ou sistêmicos, benéficos ou prejudiciais (MANZONI; CAVALLINI; ROSSI, 2008).

Um fator que gera preocupação é o uso indiscriminado de antibióticos em animais no processo de produção, deixando assim doses residuais e também no tratamento de infecções (KAUR et al., 2011).

Disbiose é o termo que vem sendo utilizado para o desequilíbrio da microbiota intestinal, definida pelo decaimento do número de microrganismos benéficos e o acréscimo dos patógenos. Já a eubiose remete a condição, processo e ação de viver bem, tendo-se o equilíbrio da microbiota intestinal. As culturas probióticas são elementos essenciais para restabelecer a eubiose, quando ocorre o desequilíbrio da microbiota seja qual for o motivo (ANTUNES et al., 2007).

Em 2013, em reunião da International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), a definição de probióticos foi atualizada para: “Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, confere um benefício de saúde ao hospedeiro”, tendo sido amplamente adotada e aprovada por pesquisadores, órgãos regulamentadores e consumidores. Organizações e agências como Organização Mundial da Saúde (OMS), Codex Alimentarius, Health Canada, World Gastroenterology Organisation, European Food Safety Authority (EFSA) e Institute of Food Technologists utilizaram a definição da FAO / OMS

quando se refere à probióticos (HILL et al., 2014).

Segundo Hill et al. (2014), por exemplo, a Health Canada vem estabelecendo desde 2009 que a quantidade de bactérias probióticas como *Bifidobacterium* (espécies *adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* e *longum*) e *Lactobacillus* (espécies *acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* e *salivarius*) em alimentos deve ser de, pelo menos,  $10^9$  unidades formadoras de colônias (CFU) por porção.

Diversas são as vantagens que a utilização de probióticos podem oferecer à saúde do hospedeiro. Tais vantagens incluem a modulação da microbiota intestinal, atenuação dos efeitos de alguns tipos de diarreias, produção de vitaminas que são absorvidas, a retomada da síntese de vitaminas (principalmente as do complexo B que é prejudicada, quando a microbiota intestinal se encontra anormal, evitando o surgimento da hipovitaminose), promoção de resistência gastrintestinal e urogenital à colonização por microrganismos patogênicos, reestruturação da microbiota intestinal após uma longa exposição à antibioticoterapia, estimulação do sistema imunológico e alívio da constipação intestinal (CANANI et al., 2007; COUDRAY et al., 2005; ISOLAURI, 2003; PELUSO et al., 2007; ROLFE, 2000; SCHIFFRIN et al., 1995; STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008).

Lactobacilos, bifidobactérias e algumas espécies de *Streptococcus* foram avaliados para a prevenção ou tratamento de diarreia associada ao uso de antibióticos, tendo sido verificados como seguros para uso como probióticos (D'SOUZA et al., 2002).

Os microrganismos probióticos podem contribuir com a “barreira intestinal”, diminuindo a translocação bacteriana, que corresponde à migração de bactérias viáveis através da mucosa intestinal para dentro da circulação. Esta função tem sido sugerida para diminuir infecções e possivelmente reações alérgicas aos antígenos alimentares (PARVEZ et al., 2006).

Para serem usadas como probióticos, mesmo entre um grupo de bactérias que é geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – *generally recognised as safe*), elas necessitam ter identificação internacionalmente reconhecida de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura, sobreviverem não só a passagem pelo trato gastrointestinal através da exibição aos sais biliares e acidez gástrica, mas também serem capazes de proliferarem no intestino; como também serem consumidas num alimento que lhe deem proteção durante a passagem pelo estômago, através dessa proliferação exercerem suas vantagens sob o hospedeiro, além de ter essas vantagens comprovadas *in vivo* e *in vitro* por meio de uma dose conhecida, determinação

dos padrões de resistência a antibiótico, serem capazes de aderirem ao muco ou epitélio intestinal, oferecerem segurança comprovada, não terem natureza patogênica, produzirem substâncias antibacterianas e influenciarem atividades metabólicas como a produção de D-lactato (PINEIRO; STANTON, 2007; ZUCCOTTI et al., 2008).

Além dos requisitos citados acima, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016) exige outras medidas a serem tomadas pelas indústrias, como: o depósito do microrganismo em banco de culturas reconhecido internacionalmente; a descrição da forma e origem de obtenção da bactéria e se houve modificação genética; resultado negativo de produção de toxinas e atividade hemolítica; conhecimento do perfil de resistência a antimicrobianos e informações sobre a base genética da resistência, quando confirmada, de acordo com a European Food Safety Authority (EFSA); estudos que estejam disponíveis na literatura que descrevam eventuais efeitos adversos observados com a cepa; a eficácia comprovada através de estudos científicos rigorosos, além da descrição de possíveis efeitos colaterais em humanos; exigência de um laudo de comprovação da viabilidade da cepa no produto na quantidade mínima viável para prover benefício funcional até o final do prazo de validade, dentro das condições de uso, armazenamento e distribuição. Dessa forma, a eficácia para propriedade funcional deve ser proposta pela empresa junto à Agência, a qual será avaliada quanto às suas alegações conforme a Resolução n. 18/1999 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

As bifidobactérias são bactérias Gram positivas anaeróbicas que estão presentes no trato gastrointestinal humano (ODA et al., 2013).

Manter a viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas, ou seja, manter um nível apropriado de células viáveis durante o armazenamento do produto, dependendo da matriz e das características do meio, sem interferir na qualidade do produto, consiste em um desafio tecnológico (GALLINA et al., 2012).

A viabilidade de bactérias probióticas pode ser melhorada pela escolha apropriada de cepas resistentes a ácidos biliares e acidez, o uso de recipientes impermeáveis ao oxigênio, influência do nível de inóculo, uso de ácido ascórbico, microencapsulação, adaptação da capacidade de se multiplicar em condições inóspitas (SHAH, 2000).

O soro de leite deixou de ser visto como um subproduto da fabricação do queijo e da precipitação após a remoção da caseína, e passa a ser percebido como um coproduto, isto é, uma matéria-prima valiosa para a produção de novos alimentos com proteína e outros nutrientes de

valor agregado. Além dos minerais e da lactose, o soro de leite contém cerca de 20% das proteínas originalmente presentes no leite (SMITHERS et al. 1996).

A hidrólise consiste em um processo de clivagem das ligações peptídicas das proteínas transformando-as em peptídeos de tamanhos variados e em aminoácidos livres (CLEMENTE, 2000).

Dessa forma, é interessante avaliar a viabilidade da multiplicação das bifidobactérias em componentes proteicos do leite, podendo levar ao desenvolvimento de novos produtos funcionais com populações apropriadas desse microrganismo, pela importância de se veicular um maior número de probióticos para garantir que o trato gastrointestinal permaneça em homeostase, frente às condições que possam acarretar o desequilíbrio dele.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Probióticos

Probióticos, que significa literalmente "para a vida", são microrganismos com influência comprovada para a promoção da saúde em humanos e animais (MARTEAU et al., 2001).

Existem vários mecanismos propostos pelos quais os probióticos podem proteger o hospedeiro de distúrbios intestinais, conforme apresentado no **Quadro 1**.

**Quadro 1** – Apresentação dos mecanismos propostos para a proteção do hospedeiro pelos microrganismos:

Mecanismo	Ação	Observações	Referências
Produção de substâncias inibidoras	As bactérias probióticas produzem uma variedade de substâncias que são inibidoras de bactérias gram-positivas e gram-negativas, estas substâncias incluem ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas	Estes compostos podem reduzir não apenas o número de células viáveis, mas também podem afetar o metabolismo bacteriano ou a produção de toxinas.	SHAH (2000)
Bloqueio de locais de adesão	Inibição competitiva para locais de aderência bacteriana em superfícies epiteliais intestinais		KLEEMAN; KLAENHAMMER (1982)
Competição por nutrientes	Os probióticos podem utilizar os nutrientes que seriam consumidos por microrganismos patogênicos		SHAH (2000)
Estímulo da imunidade	Evidências sugerem que estimulação da imunidade específica e não específica pode ser outro mecanismo para proteger contra doença intestinal		KAILA et al., (1992), PERDIGON et al., (1986)

A soma de todos os processos pelos quais as bactérias inibem a colonização por outras cepas é chamado de resistência à colonização (SHAH, 2000).

A indústria tem procurado atender as exigências dos consumidores que desejam produtos que, simultaneamente, sejam saudáveis e atrativos. Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, além da seleção de cepas probióticas para uso em humanos, as culturas devem ser empregadas de acordo com o seu desempenho tecnológico (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e ser estáveis e viáveis durante armazenamento para que a multiplicação de probióticos não venha a resultar em características não comuns ou mesmo indesejáveis ao produto. 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. Essas exigências são desafios tecnológicos significativos, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; OLIVEIRA et al., 2002).

A viabilidade das bactérias probióticas é afetada por substâncias inibidoras tais como o ácido láctico produzido durante produção e armazenamento a frio. Durante a produção de iogurte, bactérias do iogurte e bactérias probióticas produzem ácidos orgânicos. O pH do produto tem de ser 4.5 ou menor para atender aos requisitos legais e de produzir iogurte de boa qualidade. Além disso, dependendo da extensão de multiplicação das bifidobactérias, as concentrações de ácido acético poderiam variar no produto. A atividade inibidora das bactérias lácticas pode ser atribuída à criação de um ambiente hostil para agentes patogênicos de origem alimentar e deteriorantes de alimentos (SHAH, 2000).

Medidas podem ser tomadas como citadas no **Quadro 2** para que a viabilidade das bactérias probióticas possa aumentar.

**Quadro 2** – Exposição das medidas propostas para uma maior viabilidade da bactéria em produtos probióticos.

Medidas	Razões	Exemplos	Referências
Seleção de cepas resistentes à passagem pelo trato gastrointestinal humano	Os microrganismos probióticos devem ser capazes de sobreviver ao ácido no estômago e sais biliares	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp. são capazes de resistir à tais condições	GILLILAND; STALEY; BUSH (1984)
Uso de embalagens que limitem a passagem do oxigênio	Bifidobactérias são anaeróbias. A toxicidade do oxigênio é uma consideração importante porque pode facilmente dissolver-se no leite e outros alimentos líquidos.	Garrafas de vidro garantiram maior viabilidade de culturas do iogurte e probióticas no produto, ao contrário dos recipientes de plástico.	SHAH (2000)
Fidelidade às instruções do fornecedor das culturas	As instruções do fornecedor da cultura devem ser seguidas rigorosamente quanto à temperatura de incubação e a proporção de cultura probiótica a ser adicionada	A não observação das instruções irá resultar em uma viabilidade baixa de probióticos no produto final.	SHAH (2000)

Quadro 2 – Exposição das medidas propostas para uma maior viabilidade da bactéria em produtos probióticos (continuação).

Medidas	Razões	Exemplos	Referências
Microencapsulação	A exposição celular ao ácido, congelamento, alta concentração de açúcar e oxigênio é normalmente tóxica e resulta em injúria.	A microencapsulação é um processo em que as células são retidas dentro da membrana de encapsulação para reduzir a lesão celular ou perda de células.	SHAH (2000)
Adaptação ao estresse	Ambientes agressivos normalmente causam a perda da viabilidade dos <i>L. acidophilus</i> e outros probióticos.	Probióticos podem ser adaptados às condições normalmente letais (congelamento, oxigênio, ácido) previamente à sua adição em alimentos como iogurtes.	SHAH (2000)
Uso de ácido ascórbico	Acido ascórbico pode proteger contra o oxigênio. O teor de oxigênio e potencial redox foram vistos como fatores importantes para a viabilidade de bifidobactérias durante o armazenamento.	A adição de ácido ascórbico é permitida em sucos de fruta e outros produtos como um aditivo alimentar. A fortificação de iogurte com ácido ascórbico poderá aumentar o valor nutritivo do produto, além de proteger os probióticos presentes, tornando-se mais atrativo e interessante para o consumidor	SHAH (2000)

Quadro 2 – Exposição das medidas propostas para uma maior viabilidade da bactéria em produtos probióticos (continuação).

Medidas	Razões	Exemplos	Referências
Adição de cisteína	A cisteína é capaz de reduzir o potencial redox do meio. O nitrogênio presente atua como fator de crescimento de microrganismos.	O uso de cisteína em meio de culturas e alimentos tem garantido a capacidade de multiplicação de bifidobactérias.	SHAH (2000)

Diversos produtos lácteos probióticos, principalmente fermentados, vêm sendo desenvolvidos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; OLIVEIRA et al., 2002). São encontrados no mercado brasileiro, por exemplo, leites fermentados aromatizados ou não, iogurtes, mix de leite fermentado com frutas e cereais e queijos (COOPERATIVA SANTA CLARA, 2016; DANONE BRASIL, 2016; YAKULT, 2011). Dentre os produtos considerados como farmacêuticos comercializados no Brasil podem ser citados alguns na forma de suplemento alimentar de 6 g gramas para misturar com bebidas frias, suspensão oral e comprimidos contendo probióticos como o Leiba® (União Química) e Floratil® (Merck) respectivamente (FARMA NUTRIÇÃO FQM, 2016; MERCK, 2014; SANOFI, 2016; UNIÃO QUÍMICA, 2011).

## 2.2 Hidrolisado proteico de soro de leite

A produção dos hidrolisados proteicos pode ser realizada pelos tipos de hidrólise enzimática, ácida ou alcalina. O processo de hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, como especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial para a produção em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (CLEMENTE, 2000).

A fabricação dos hidrolisados utiliza processos comuns aos demais ingredientes da indústria de alimentos, como coadjuvantes de grau alimentício e equipamentos apropriados. As

enzimas utilizadas são enzimas proteolíticas (pepsina, quimotripsina, tripsina), obtidas a partir de animais, ou enzimas de nível alimentar obtidas a partir de partes comestíveis de plantas e de microrganismos com uma utilização segura aceitável em nutrição humana (SCHAAFSMA, 2009).

Nas últimas décadas, numerosas pesquisas vêm demonstrando as qualidades nutricionais das proteínas solúveis do soro do leite, também conhecidas como *whey protein*. As proteínas do soro são extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo. Durante décadas, essa parte do leite era dispensada pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70, os cientistas passaram a estudar as propriedades dessas proteínas. (HARAGUCHI et al., 2006).

As proteínas de leite são utilizadas na forma de hidrolisados, onde normalmente são reduzidas a aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular (PACHECO et al., 2005).

As proteínas do soro promovem a formação dos ossos em humanos, estimulando a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, aumentando a densidade mineral óssea e inibindo a reabsorção de cálcio, além das evidências que sustentam a teoria de que as proteínas do leite, incluindo as proteínas do soro, além de seu alto valor biológico, possuem peptídeos bioativos, que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, antioxidantes reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006; TOBA et al. 2001).

### **2.3 Bifidobactérias**

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier, sendo, em geral caracterizados por serem microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidas de flagelos, catalase negativa e anaeróbios (STEFÉ; ALVES; RIBEIRO, 2008).

Pertencente ao filo e classe de *Actinobacteria*, dentro do qual eles formam a ordem *Bifidobacteriales*, a família *Bifidobacteriaceae* inclui o gênero *Bifidobacterium*, contemplando cerca de 55 espécies (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; SMIDT; DE VOS, 2007).

Em geral, as bactérias do intestino degradam polissacarídeos a oligossacarídeos de baixo peso molecular, que podem ser, subsequentemente, degradados para monossacarídeos através da utilização de uma ampla gama de enzimas de hidrólise de carboidratos. No caso de

bifidobactérias, estes monossacarídeos são convertidos em intermediários pela via de fermentação de hexoses, na qual atua a enzima frutose-6-fosfatofosfocetolase, um marcador taxonômico da família Bifidobacteriaceae, além de outras enzimas. Esta via permite que o metabolismo de um mol de hexose pelas bifidobactérias produza 2,5 moles de ATP, assim como um mol de acetato e um mol de lactato. Este metabolismo difere das bactérias lácticas homofermentativas, que produzem apenas 2 moles de ATP e 2 moles de ácido láctico a partir de 1 mol de glicose, e também das heterofermentativas, que produzem 1 mol tanto de ácido láctico, como de etanol e ATP a partir de 1 mol de glicose. A razão de lactato/acetato formada pelas bifidobactérias pode variar dependendo da fonte de carbono utilizada e também da espécie examinada. Tais diferenças observadas em relação ao metabolismo de hexoses pelas bifidobactérias em relação às bactérias lácticas é conhecido por “desvio da frutose-6-fosfato” ou “desvio bífido” (*bifid shunt*, em inglês) (DE VRIES et al., 1976; POKUSAEVA; FITZGERALD; SINDEREN, 2011).

A temperatura ideal para o desenvolvimento das de espécie humana é entre 36 e 38°C. Em contraste, as de espécie animal apresentam temperatura ligeiramente mais elevada, cerca de 41-43 °C, podendo atingir 46,5 °C. Não há multiplicação abaixo 20 °C. As bactérias deste gênero não apresentam termorresistência acima de 46°C como, por exemplo, a *B. bifidum* que é destruída em 60 °C. Já o pH ótimo para multiplicação inicial é entre 6,5 e 7,0. Nenhuma multiplicação consegue ocorrer em pH abaixo de 5,0 ou acima de 8,0 (KLAENHAMMER et al., 2002).

A degradação da glicose é exclusiva e especificamente pela via frutose-6-fosfato. A fermentação de dois moles de glicose totaliza em três moles de ácido acético e dois moles de ácido láctico. Na realidade, o ácido pirúvico pode ser dividido ao longo de duas vias: a primeira é a redução do piruvato para formar ácido láctico pela desidrogenase, uma enzima controlada pela frutose-1,6-difosfato. A segunda via envolve a separação do piruvato por fosforilação para formar o ácido fórmico e acetil fosfato, uma parte do qual é subsequentemente reduzida ao álcool etílico, regenerando assim NAD<sup>+</sup>. As proporções dos produtos finais de fermentação podem variar consideravelmente de uma cepa para outra e até mesmo dentro da mesma espécie. Algumas cepas produzem uma pequena quantidade de CO<sub>2</sub> que podem ser produzidos durante a degradação de gluconato (DE FELIPE et al., 1998).

Além dos hidrolisados proteicos de soro de leite, uma gama de outros ingredientes proteicos do leite vem sendo estudados, a fim de ampliar a variedade para que possa abranger um

público maior de consumidores de produtos lácteos. Como no estudo de Gagnon et al. (2014) que usaram o leite fermentado com cepas de *Bifidobacterium longum*, isoladas tanto do cólon infantil como do adulto. O microrganismo *B. longum* subsp. *longum* representa subespécies comuns do intestino que, ao utilizar seu mecanismo de defesa contra a presença de oxigênio, resulta na produção de substâncias antioxidantes benéficas à saúde humana.

No estudo de Oda et al. (2013), os autores pesquisaram a atividade da lactoferrina, uma glicoproteína encontrada no leite de mamíferos (nesse caso, o bovino), sobre as bifidobactérias. Posteriormente observou-se que o hidrolisado de lactoferrina obtido com hidrólise por pepsina mostrou atividade bifidogênica, isto é, que resulta em estímulo da multiplicação de bifidobactérias, muito mais forte do que a própria lactoferrina. Cepas de diferentes bifidobactérias foram testadas tanto com a glicoproteína como com o hidrolisado em ensaios posteriores.

Nos teste realizados por Azuma et al. (1984) com caseína hidrolisada de origem bovina e humana, que por si só tinham atividade promotora sobre a multiplicação de bifidobactérias sem qualquer tratamento, foi verificado que atividade era mais eficaz após o tratamento da proteína com quimosina ou pepsina.

Dessa forma, os hidrolisados proteicos de soro de leite encontram utilização numa grande gama de aplicações, uma vez que proporcionam um número maior de vantagens quando em comparação com proteínas de soro de leite concentrada ou isoladas (KHAN, 2013).

Tendo em vista o levantamento bibliográfico feito, essas vantagens poderão dar condições mais favoráveis de multiplicação para as bactérias, diminuindo consequentemente a quantidade de inóculo e evitando o uso de outras substâncias promotoras e/ou protetoras que, no caso da ausência do hidrolisado, precisariam ser utilizadas para permitir elevada viabilidade. Sendo assim, tal redução resultaria em um ganho econômico para a indústria, além de permitir um número maior de células viáveis nos produtos e, como consequência, também no trato gastrointestinal do homem. Esses fatores têm levado ao aumento do interesse das indústrias em ampliar os estudos de probióticos em hidrolisados proteicos de soro de leite, especialmente para cepas de bifidobactérias.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a multiplicação de bifidobactérias em hidrolisado proteico de soro de leite.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) testar os efeitos de diferentes concentrações de hidrolisado proteico na multiplicação de bifidobactérias;
- b) comparar os efeitos das concentrações de hidrolisado proteico em três diferentes cepas de bifidobactérias;
- c) identificar entre as três cepas de bifidobactérias testadas a mais promissora para uso em conjunto com o hidrolisado proteico em produtos lácteos e suas razões.

## 4 METODOLOGIA

O hidrolisado proteico de soro de leite utilizado neste estudo foi obtido a partir da hidrólise da proteína do soro lácteo utilizando pepsina, sendo fornecido pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ) e enviado para o Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos da Universidade Estadual da Paraíba. O hidrolisado proteico foi armazenado sob congelamento (-18°C) até o uso nos ensaios de multiplicação de bifidobactérias, realizados segundo a metodologia adaptada de Gomes et al. (1998) e Oda et al. (2013).

Foram usadas culturas liofilizadas de três cepas de bifidobactérias – *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen) *Bifidobacterium bifidum* CCT7603 (Fundação André Tosello) e *Bifidobacterium longum* BGL301 (Granotec), armazenadas sob congelamento até a realização das análises.

As culturas liofilizadas foram ativadas em caldo MRS-C preparado com o caldo base de Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, MD, EUA) enriquecido com cisteína (hidroclorato de L-cisteína monoidratada Merck, Darmstadt, Alemanha, 0,05 g para 100 ml de caldo) (ODA et al., 2013) por 24 h em anaerobiose (gerador de anaerobiose Anaerobac, Probac do Brasil). As culturas foram reativadas a cada 15 dias em caldo MRS-C, mantendo assim, a sua viabilidade para os testes.

Para os ensaios, foi realizada a leitura das culturas ativadas em espectrofotômetro UV Vis Spectrophotometer Meter (modelo SP 2000 UV, Spectrum, Shangai, China) no comprimento de onda de 630 nm (ODA et al., 2013). De acordo com a concentração necessária para os ensaios (6 a 7 log UFC/ml, densidade óptica de aproximadamente 0,8 em 630 nm), foram definidas as diluições necessárias para o preparo do inóculo.

O inóculo (com densidade óptica inicial de 1,653 a 2,568, correspondente a 9 a 10 log UFC/ml) foi diluído com solução salina em tubos de ensaio estéreis para uso nos testes, de modo a ser utilizada uma alíquota de 50 µl da diluição (aproximadamente 5 a 6 log UFC), conforme apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Diluição do inóculo para uso nos ensaios com bifidobactérias.

Diluição	Volume do caldo contendo a cultura (ml)	Volume de solução salina (ml)	Volume de solução (ml)	Volume final	Proporção final de bactéria na diluição
1	1	9	10		1:10
2	1	9	10		1:100
3	1	3	4		1:400

Foi realizado o preparo de uma solução mãe contendo hidrolisado proteico na concentração de 4 mg/ml, pesando-se 80 mg de hidrolisado em 20 ml de água destilada. Esse conteúdo foi esterilizado por filtração utilizando membrana de 0,2 µm em ambiente estéril. A partir dessa solução mãe estéril foram realizadas duas diluições, conforme apresentado na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Diluição da solução mãe para uso nos ensaios com bifidobactérias.

Diluição	Volume de solução mãe (ml)	Volume de água destilada (ml)	Volume de água estéril (ml)	Volume final	Concentração de hidrolisado na diluição (mg/ml)
1	5	5	10		2
2	2,5	7,5	10		1

A partir da diluição 2, foi realizado o preparo de uma terceira diluição (diluição 3), conforme apresentado na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Diluição da “diluição 2” para uso nos ensaios com bifidobactérias.

Diluição	Volume de diluição 2 (ml)	Volume de água destilada (ml)	Volume de água estéril (ml)	Volume final	Concentração de hidrolisado na diluição (mg/ml)
3	1	19	20		0,05

Para a realização dos ensaios de avaliação dos efeitos das diferentes concentrações de hidrolisado proteico sobre a multiplicação das bifidobactérias, foram utilizadas alíquotas de 0,05 ml da diluição dos microrganismos, 3 ml de caldo MRS-C e 1 ml da solução mãe e/ou diluições do hidrolisado, conforme a **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Componentes utilizados no ensaio com as bifidobactérias.

Ensaio	Cepa	Volume da diluição do inóculo (ml)	Volume de caldo MRS-C (ml)	Forma do hidrolisado ou água utilizada no ensaio e volume (ml)	Concentração final de hidrolisado utilizado no ensaio (mg/ml)
1	BB12	0,05	3	Solução mãe – 1 ml	1
2	BB12	0,05	3	Diluição 1 – 1 ml	0,5
3	BB12	0,05	3	Diluição 2 – 1 ml	0,25
4	BB12	0,05	3	Diluição 3 – 1 ml	0,01
5	BB12	0,05	3	Água estéril – 1 ml	0
6	CCT 7603	0,05	3	Solução mãe – 1 ml	1
7	CCT 7603	0,05	3	Diluição 1 – 1 ml	0,5
8	CCT 7603	0,05	3	Diluição 2 – 1 ml	0,25
9	CCT 7603	0,05	3	Diluição 3 – 1 ml	0,01
10	CCT 7603	0,05	3	Água estéril – 1 ml	0
11	BGL301	0,05	3	Solução mãe – 1 ml	1
12	BGL301	0,05	3	Diluição 1 – 1 ml	0,5
13	BGL301	0,05	3	Diluição 2 – 1ml	0,25
14	BGL301	0,05	3	Diluição 3 – 1ml	0,01
15	BGL301	0,05	3	Água estéril – 1 ml	0

BB12 = *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12; CCT7603 = *Bifidobacterium bifidum* CCT7603; BGL301 = *Bifidobacterium longum* BGL301.

Os tubos contendo os componentes de cada ensaio foram colocados em jarra de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose (Anaerobac) e incubados por 24 h. A turvação após 24 horas foi o indício de que o conteúdo estava apto para prosseguimento dos testes. A partir do tubo com a turvação foram realizadas diluições decimais em série com solução salina. Alíquotas

de 1 ml das diluições dos ensaios foram transferidas para placas de Petri de vidro estéreis para semeadura de ágar MRS-C (ágar MRS preparado com cisteína adicionada na proporção 0,05 g/100 ml) em profundidade (técnica de *pour plate*) e incubação das placas após o endurecimento do meio de cultura em jarras de anaerobiose por 72 h (GOMES et al., 1998). Após a incubação foram realizadas as análises das placas para classificar as aptas para a contagem das colônias com o auxílio de um contador de colônias eletrônico.

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. Para a realização dos testes estatísticos, os resultados foram avaliados quanto à normalidade e à homogeneidade de variâncias. Os dados que atenderam à normalidade e homogeneidade de variâncias foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os demais dados foram analisados por testes não paramétricos, tendo sido usado o programa estatístico STATISTICA® 7.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios com bifidobactérias e hidrolisado proteico de soro estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Resultados da análise referente à multiplicação das bactérias.

Tratamento	Hidrolisado proteico de soro no meio de cultura (mg/ml)				
	0	0,0125	0,250	0,500	1,000
	<i>Bifidobacterium</i> spp. (log UFC/ml)				
BB12	8,56 ± 0,42Aa	8,53 ± 0,36Aa	8,49 ± 0,36Aa	8,44 ± 0,40Aa	8,74 ± 0,47Aa
CCT7603	8,50 ± 0,27Aa	8,74 ± 0,16Aa	8,83 ± 0,11Aa	8,92 ± 0,13Aa	8,76 ± 0,22Aa
BLG301	8,63 ± 0,23Aa	8,77 ± 0,47Aa	8,65 ± 0,32Aa	8,65 ± 0,31Aa	8,71 ± 0,27Aa

a,b letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) para um mesmo tratamento entre as diferentes concentrações de hidrolisado.

A,B letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) para uma mesma concentração de hidrolisado entre os diferentes micro-organismos.

Não foram verificadas diferenças significativas entre a multiplicação de bifidobactérias, tanto entre as cepas analisadas, como entre as concentrações de hidrolisado proteico de soro ( $p > 0,05$ ).

Com base na **Tabela 5**, pode ser observado que, para a bactéria BB12 o estímulo da sua multiplicação na concentração de 1,0 mg/ml de hidrolisado aumentou em apenas 0,18 ciclo log em comparação ao controle sem hidrolisado e em 0,3 ciclo log quando comparado à concentração de 0,5 mg/ml de hidrolisado. Já para CCT7603, apesar de não significativo, houve também um estímulo da multiplicação até 0,5 mg/ml de hidrolisado em 0,42 ciclo log, tendo sido maior que o observado para a cepa BB12; entretanto, pode ser percebido também um leve efeito inibitório na concentração 1,0 mg/ml do hidrolisado. Por outro lado, para a cepa BLG301 não houve uma tendência clara de estímulo ou inibição da multiplicação na presença do hidrolisado proteico.

No estudo feito por Correia et al. (No Prelo), foi realizada a análise direta do caldo contendo os microrganismos cultivados na presença de hidrolisado proteico em microplacas também em absorbância de 630 nm. Naquele estudo, as cepas de bifidobactérias CCT7603, BB12 e BLG301 foram inibidas na presença de 10 mg/ml de hidrolisado. Por este motivo, tal

concentração não foi utilizada no presente estudo. Naquele estudo ainda, a concentração de 1 mg/ml de hidrolisado também foi inibitória para a cepa BB12. De modo contrário, neste estudo a cepa BB12 apresentou a maior viabilidade (8,74 log UFC/ml) na concentração de 1 mg/ml de hidrolisado. Esta diferença da multiplicação da cepa BB12 na presença de 1 mg/ml de hidrolisado na microplaca em comparação ao cultivo em tubo de ensaio e posterior plaqueamento pode ter sido resultante da condição de anaerobiose ser mais favorável no cultivo em tubo (presente estudo) que no uso de microplacas (Correia No Prelo). Dessa forma, outros estudos serão necessários para confirmar os reais efeitos do hidrolisado proteico de soro sobre essa cepa.

Por outro lado, no estudo de Correia et al. (No Prelo), a cepa BLG 301 foi estimulada na concentração de 1 mg/ml de hidrolisado. No presente estudo, entretanto, o estímulo da cepa BLG301 na concentração de 1 mg/ml de hidrolisado não foi confirmado, uma vez que o valor observado (8,71 log UFC/ml) foi praticamente igual ao valor obtido na concentração de 0,0125 mg/ml. Dessa forma, independente de qual foi o método usado para avaliar o comportamento do microrganismo em hidrolisado proteico de soro de leite, não houve uma tendência de estímulo da multiplicação da BLG301 em ambos os estudos, diferente do observado para as demais.

Para a cepa CCT7603, no estudo em microplacas de Correia et al. (No Prelo) este microrganismo apresentou um estímulo da densidade ótica a 630 nm de 0,120 na ausência de hidrolisado para 0,248 na concentração de hidrolisado de 0,01 mg/ml. Quando comparado à avaliação em placas de Petri deste estudo, também foi observado um leve aumento de 8,5 log UFC/ml na ausência do hidrolisado para 8,74 log UFC/ml na concentração de hidrolisado de 0,0125 mg/ml. Apesar de não significativos ( $p > 0,05$ ), pequenos aumentos subsequentes da viabilidade desse microrganismo foram obtidos também nas concentrações de 0,250 mg/ml e 0,5 mg/ml no presente estudo. Apesar de não significativo ( $p > 0,05$ ), neste estudo e no trabalho de Correia et al. (No Prelo), foi observada tendência de efeito inibitório do hidrolisado proteico de soro de leite sobre a cepa CCT7603 quando adicionado nas concentrações mais elevadas (1,0 mg/ml em ambos os estudos e 10 mg/ml no estudo com microplacas).

Tais resultados reforçam a necessidade de estudo dos ingredientes em várias concentrações sobre os microrganismos uma vez que, um mesmo ingrediente pode exercer tanto efeito inibidor como estimulante dependendo da dose utilizada.

Reforça-se também a importância das bactérias probióticas serem adicionadas em meios proteicos como o hidrolisado proteico de soro de leite. O principal motivo para isso seria devido

ao retardamento do declínio do pH (efeito tamponante), permitindo assim maior sobrevivências das cepas e evitando que a multiplicação seja tão lenta, além de manter o pH estável durante o armazenamento. Dessa forma, se fosse utilizado o leite *in natura* ou o leite em pó, a mesma atividade poderia não ser observada, uma vez que estes microrganismos não possuem atividade proteolítica sobre as proteínas do leite e, dessa forma, não poderiam utilizar facilmente os peptídeos e aminoácidos presentes. Assim, o hidrolisado facilitaria a assimilação de peptídeos e aminoácidos pelos microrganismos probióticos.

No estudo de Oda et al (2013), foram analisadas as atividades bifidogênicas da lactoferrina *in natura*, do hidrolisado desta proteína obtido pela digestão com pepsina e também do isolado proteico de soro de leite contra as cepas de bifidobactérias *B. breve* ATCC15700 e *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, sendo esta última da mesma espécie da cepa BLG301 analisada no presente estudo. No caso específico dos resultados com *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 por aqueles autores, as concentrações eficazes mínimas do hidrolisado de lactoferrina do isolado proteico de soro de leite isolado foram 30 e 300 µg/ml, respectivamente. A lactoferrina *in natura* não mostrou atividade bifidogênica nas mesmas concentrações. Para as duas cepas analisadas por aqueles autores, o hidrolisado de lactoferrina mostrou maior atividade bifidogênica que a lactoferrina *in natura* ou o isolado proteico de soro. Os autores confirmaram assim a influência positiva da presença de proteínas em sua forma hidrolisada para uma maior viabilidade da multiplicação das bifidobactérias.

Na pesquisa de Charteris et al. (1998) foi desenvolvida uma metodologia *in vitro* que imita o trânsito no gastrointestinal humano vivo. A tolerância de espécies de lactobacilos e bifidobactérias ao trato gastrintestinal foi determinada naquele estudo. De modo geral, as cepas de bifidobactérias mantiveram viabilidade durante trânsito intestinal simulado, sendo considerados intrinsecamente tolerantes. Apenas *Bifidobacterium adolescentis* 15703 mostrou uma redução progressiva da viabilidade, sendo considerada intrinsecamente sensível. *Bifidobacterium breve* 15700 também mostrou uma redução na viabilidade no início dos testes, mas recuperou a viabilidade após 4 h de ensaio. Os mesmos autores estudaram também o efeito da adição da proteína do leite (caseinato de sódio, isolado proteico de soro e a mistura dos dois ingredientes em igual proporção), na viabilidade dos microrganismos durante o trânsito gástrico e entérico. Em geral, a adição das proteínas do leite (isoladas ou combinadas) melhorou a tolerância dos probióticos à etapa gástrica, mas não teve influência sobre a etapa entérica. As

cepas *Lactobacillus casei* 212.3 e *B. infantis* 25962 que exibiram completa tolerância ao trânsito gástrico simulado na presença do isolado proteico de soro. Dessa forma, reafirma-se que os ingredientes proteicos do soro podem ser favoráveis à sobrevivência das bifidobactérias em determinados estágios do trânsito gastrointestinal.

Petschow e Talbott (1990) realizaram um ensaio *in vitro* para estudar a atividade de promoção do leite humano, do leite de vaca e das frações do soro de leite e da caseína de ambos os tipos de leite sobre a multiplicação de cinco cepas de bifidobactéria. A atividade de promoção do leite humano foi maior do que a do leite de vaca para *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15708. Os autores verificaram que o soro do leite humano e o soro de leite de vaca foram altamente ativos no estímulo dos microrganismos. Já a caseína do leite humano foi apenas ligeiramente ativa, enquanto que a caseína do leite de vaca foi quase inativa. Naquele estudo, apenas a cepa *B. bifidum* ATCC 15696 mostrou maior resposta de multiplicação na presença de caseína do leite humano que no soro de leite de vaca. Estes resultados fornecem mais um indício da possibilidade de uma boa viabilidade para essa espécie de bifidobactéria, como foi apontado no presente trabalho também para *B. bifidum* CCT7603.

Considerando o comportamento de bifidobactérias em outros nutrientes, como os carboidratos, Gallina et al. (2012) avaliaram a viabilidade de duas espécies de probióticos, *B. longum* e *B. animalis*, adicionadas em iogurtes com e sem frutooligossacarídeos durante 28 dias de armazenamento a 4 °C. Naquele estudo, a viabilidade foi afetada pelo tipo de cepa e pela presença de frutooligossacarídeos, sendo que a espécie *B. animalis* apresentou melhor resultado de estabilidade que *B. longum*, sendo que o maior número de bifidobactérias no iogurte foi obtido com a adição de frutooligossacarídeos. Mesmo considerando a natureza diferente do ingrediente estudado naquele estudo (carboidratos), estes resultados se aproximam dos obtidos no presente estudo com hidrolisado proteico em que a ausência de estímulo da multiplicação da espécie *B. longum* foi observada quando em comparação com as demais cepas avaliadas.

## 6 CONCLUSÃO

O hidrolisado proteico de soro de leite, independente das concentrações utilizadas, não resultou em diferença significativa na multiplicação das cepas das bifidobactérias analisadas. Porém, para a cepa CCT7603, o hidrolisado resultou em uma leve tendência de promoção da viabilidade desse microrganismo na concentração de 0,5 mg/ml. Considerando a possibilidade de uso de uma cultura de bifidobactérias em um produto contendo hidrolisado proteico, a cepa *B. bifidum* CCT7603 seria a escolhida. Reforça-se também a necessidade de outros estudos a cerca de ingredientes que influenciam positivamente a viabilidade das bifidobactérias, principalmente porque, dependendo da quantidade utilizada, podem resultar em efeito contrário, inibindo a multiplicação, conforme é relatado em vários estudos.

## REFERÊNCIAS

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 03 dez. 1999. Seção 1, p. 23-24.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**, Brasília, 2016. Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 05 out. de 2016.
- ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probióticos: agentes promotores de saúde. **Nutrire**: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007. Disponível em: [http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/probioticos\\_agentes\\_promotores\\_de\\_saude.pdf](http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/probioticos_agentes_promotores_de_saude.pdf). Acesso em: 17 ago. 2016.
- AZUMA, N.; YAMAUCHI, K.; MITSUOKA, T. Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human k-casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, n. 8, p. 2159-2162, 1984. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00021369.1984.10866469>>. Acesso em: 05 out. 2016.
- CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO, M. I.; VINCENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. **British Medical Journal**, London, v. 335, n. 7614, p. 340, 2007. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1949444/>>. Acesso em: 17 ago. 2016.
- CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Singapore, v. 84, p. 759-768, 1998. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x/epdf>>. Acesso em: 07 out. 2016.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000. Disponível em:< [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3) >. Acesso em: 19 ago. 2016.
- COOPERATIVA SANTA CLARA. **Queijo minas frescal SanBIOS**. Carlos Barbosa, 2016. Disponível em: < <http://www1.coopsantaclara.com.br/espacosaude//sanbios>>. Acesso em: 21 out. 2016.

CORREIA, J. O.; BURITI, F. C. A.; ROSA, L. O.L.; CABRAL, L. M.; K. SANTOS, M. O. DOS; SILVA, C. M. Comportamento de culturas de bifidobactérias na presença de hidrolisado proteico de soro de leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 28., 2016, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: FAURGS/SBCTA, No Prelo.

COUDRAY, C.; RAMBEAU, M.; FEILLET-COUDRAY, C.; TRESSOL, J. C.; DEMIGNE, C.; GUEUX, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach.

**Nutrition Journal**, London, v. 4, p. e29.1-e29.8, 2005. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1283151/pdf/1475-2891-4-29.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

DANONE BRASIL. **Danone Activia®**: nossos produtos. São Paulo, 2016. Disponível em:

<<http://www.activiadanone.com.br/br/content/nossos-produtos#VKyTgFe4w3goqB5u.97>>. Acesso em: 21 out. 2016.

D'SOUZA, A. L.; RAJKUMAR, C.; COOKE, j.; BULPITT, C. J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. **British Medical Journal**, London, v. 324, p. 1-6. 2002. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/bmj/324/7350/1361.full.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

DE FELIPE, F. L.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. DE; HUGENHOLTZ, J. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 180, n. 15, p. 3804-3808, 1998. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/180/15/3804.full.pdf+html>>. Acesso em: 18 set. 2016.

DE VRIES, W.; STOUTHAMER, A. H. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 93, n. 2, p. 574-576, 1967. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC276478/pdf/jbacter00408-0104.pdf>>. Acesso em> 18 ago. 2016.

FARMANUTRIÇÃO FQM. **Simbioflora®**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em:

<<http://www.farmanutricaofqm.com.br/simbioflora/>>. Acesso em: 21 out. 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GAGNON, M.; SAVARD, P.; RIVIÈRE, A.; LAPOINTE, G.; ROY, D. Bioaccessible antioxidants in milk fermented by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. e169381.1-e169381.12, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/169381>>. Acesso em: 04 out. 2016.

GALLINA, A. D.; 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**, Minas Gerais, n. 386, p. 45-54, 2012. Disponível em: <[http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/caracterizacao\\_de\\_bebida\\_obtida\\_a\\_partir\\_de](http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/caracterizacao_de_bebida_obtida_a_partir_de)

\_leite\_fermentado.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2016.

GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal Dairy Science**, Lausanne, v. 67, p. 3045–3051, 1984. Disponível em: < [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(84\)81670-7/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(84)81670-7/pdf)>. Acesso em: 18 set. 2016.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.; KLAVER, F. A. M. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal of Dairy Science**, Lausanne, v. 81, n. 11, p. 2817–2825, 1998. Disponível em: < [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(98\)75840-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(98)75840-0/pdf)>. Acesso em: 09 set. de 2016.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, p. 479–488, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v19n4/a07v19n4.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 11, p. 506–514, 2014. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrgastro/journal/v11/n8/full/nrgastro.2014.66.html>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

ISOLAURI, E. Probiotics for infectious diarrhoea. **Gut**, London, v. 52, n. 3, p. 436–437, 2003. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773578/>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SOPPI, E.; VIRTANEN, E.; LAINE, S.; ARVILOMMI, H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 32, n. 2, p 141–144, 1992. Disponível em: <<http://www.nature.com/pr/journal/v32/n2/pdf/pr1992164a.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

KAUR, N., CHEN Chun-Chia, LUTHER J., KAO, J. Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, Michigan, 2:4, p. 211-216. 2011. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/gmic.2.4.17863?needAccess=true>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

KHAN, S. H. Whey protein hydrolysates: techno-functional perspective. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, Orange, v. 4, p. 1-3, 2013. Disponível em: < <http://www.ijabpt.org/applied-biology/whey-protein-hydrolysates-technofunctional-perspective.php?aid=4702>>. Acesso em: 05 out. 2016.

KLAENHAMMER, T.; ALTERMANN, E.; ARIGONI, F.; BOLOTIN, A.; BREIDT F.; BROADBENT, J.; CANO, R.; CHAILLOU, S.; DEUTSCHER, J.; GASSON, M.; GUCHTE, M.

V. DE; GUZZO, J.; HARTKE, A.; HAWKINS, T.; HOLS, P.; HUTKINS, R.; KLEEREBEZEM, M.; KOK, J.; KUIPERS, O.; LUBBERS, M.; MAGUIN, E.; MCKAY, L.; MILLS, D.; NAUTA, A.; OVERBEEK, R.; PEL, H.; PRIDMORE, D.; SAIER, M.; SINDEREN, D. V.; SOROKIN, A.; STEELE, J.; O'SULLIVAN, D.; VOS, W. DE; WEIMER, B.; ZAGOREC, M.; SIEZEN, R.. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie van Leeuwenhoek**, New York, v. 82, p. 29-58, 2002. Disponível em: <[https://fbns.ncsu.edu/KlaenhammerLab/Publications\\_pdf/Discovering.pdf](https://fbns.ncsu.edu/KlaenhammerLab/Publications_pdf/Discovering.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2016.

KLEEMAN, E. G.; KLAENHAMMER, T. R. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. **Journal Dairy Science**, Lausanne, v. 65, n. 11, p. 2063–2069, 1982. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(82\)82462-4/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(82)82462-4/pdf)>. Acesso em: 18 set. 2016.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008. Disponível em:<[http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/6085/art\\_KOMATSU\\_Inovacao\\_persistencia\\_e\\_criatividade\\_superando\\_barreiras\\_no\\_2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/6085/art_KOMATSU_Inovacao_persistencia_e_criatividade_superando_barreiras_no_2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 04 out. 2016.

MANZONI, M. S. J.; CAVALLINI, D. C. U.; ROSSI, E. A. Efeitos do consumo de probióticos nos lipídeos sanguíneos. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 351-360, 2008. Disponível em: <<http://superlactobacillus.com.br/wp-content/uploads/2013/05/Lacto-9.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

MARTEAU, P. R.; VRESE, M. DE; CELLIER, C. J.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Rockville, v. 73, n. 3, p 430-436, 2001. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/430s.full.pdf+html>>. Acesso em: 05 out. 2016.

MERCK. **Floratil®**. Darmstadt, 2014. Disponível em: <[www.floratil.com.br](http://www.floratil.com.br)>. Acesso em: 21 out. 2016.

ODA, H.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; SATO, T.; XIAO, Jin-Zhong; ABE, F.; IWATSUKI, K. Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 6, p. 1843-1849, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592234/>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

OLIVEIRA, M. N. DE; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. I. M. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lng=en)>. Acesso em: 18 ago. 2016.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n2/25034.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S. A.; KIM K. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Singapore, v. 100, n. 6, p. 1171 – 1185, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>> Acesso em: 01 set. 2016.

PELUSO, I.; FINA, D.; CARUSO, R.; STOLFI, C.; CAPRIOLI, F.; FANTINI, M. C.; CASPANI, G.; GROSSI, E.; DI IORIO, L.; PAONE, F. M.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1730-1737, 2007. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/75/4/1730.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

PERDIGON, G.; DE MACIAS, M. E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; DE RUIZ HOLGADO, A. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Immunology**, London, v. 63, p. 404–410, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1454705/pdf/immunology00158-0024.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

PETSCHOW, B. W.; TALBOT, R. D. Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269592/pdf/jcm00050-0137.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2016.

PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic bacteria: legislative framework— requirements to evidence basis. **The Journal of Nutrition**, Rockvill. v. 137, n. 3, p. 850-853. 2007. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/content/137/3/850S.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

POKUSAEVA, K.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. **Genus and Nutrition**, New York, v. 6, p. 285-306, 2011. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145055/pdf/12263\\_2010\\_Article\\_206.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145055/pdf/12263_2010_Article_206.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2016.

RAJILIC-STOJANOVIC, M.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 9, p. 2125-2136, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2007.01369.x/epdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/130/2/396.full.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências**

**Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/viewFile/44095/47716>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

SANOFI. **Enterogermina®**. [Suzano]. [2016]. Disponível em: <<http://www.farmadelivery.com.br/media/upload/pdf/BULAS/SANOFI-AVENTIS/Enterogermina.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2016.

SCHAAFSMA G. Safety of protein hydrolysates, fractions there of and bioactive peptides in human nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 63, p. 1161–1168, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/ejcn/journal/v63/n10/pdf/ejcn200956a.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

SCHIFFRIN, E. J.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J. M.; DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Lausanne, v. 78, n. 3, p. 491-497, 1995. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(95\)76659-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(95)76659-0/pdf)>. Acesso em: 17 ago. 2016.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Lausanne, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)74953-8/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)74953-8/pdf)>. Acesso em: 18 ago. 2016.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; SILVA, K. J. DE; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; MCINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; REGESTER, G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Lausanne, v. 79, n. 8, p. 1454-1459, 1996. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(96\)76504-9/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(96)76504-9/pdf)>. Acesso em: 18 ago. 2016.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008. Disponível em: <[http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos\\_teses/Biologia/Artigos/alimentos.pdf](http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/Biologia/Artigos/alimentos.pdf)>. Acesso em: 16 ago. 2016.

TOBA, Y.; TAKADA, Y.; MATSUOKA, Y.; MORITA, Y.; MOTOURI, M.; HIRAI, T.; SUGURI, T.; AOE, S.; KAWAKAMI, H.; KUMEGAWA, M.; TAKEUCHI, A.; ITABASHI, A. milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 6, p. 1353-1357, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.65.1353>>. Acesso em: 18 set. 2016.

UNIÃO QUÍMICA. **Leiba®**. São Paulo, 2011. Disponível em: <[http://www.uniaoquimica.com.br/index.php?option=com\\_zoo&task=item&item\\_id=373&Itemid=282&lang=es](http://www.uniaoquimica.com.br/index.php?option=com_zoo&task=item&item_id=373&Itemid=282&lang=es)>. Acesso em: 21 out. 2016.

YAKULT. **Leite fermentado Yakult**. [São Bernardo do Campo], 2011. Disponível em: <<http://www.yakult.com.br/yakult/default.aspx?mn=217&c=229&s=0>>. Acesso em: 21 out. 2016.

ZUCCOTTI, GV.; MENEGHIN F.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Probiotics in clinical practice: an overview. **Journal of International Medical Research**, Northampton, v.36, p. 1A-53A, 2008. Supplement 1. Disponível em: <[http://imr.sagepub.com/content/36/1\\_suppl/1A.full.pdf](http://imr.sagepub.com/content/36/1_suppl/1A.full.pdf)>. Acesso em: 17 ago. 2016.