

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**

**UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE**

**CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO**

**MARIA HELOISA ALVES NASCIMENTO**

**IOGURTE CAPRINO SABOR GOIABA SUPLEMENTADO  
COM OLIGOFRUTOSE E FERMENTADO COM *L.*  
*acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico**

Cuité/PB

2016

MARIA HELOISA ALVES NASCIMENTO

**IOGURTE CAPRINO SABOR GOIABA SUPLEMENTADO COM OLIGOFRUTOSE  
E FERMENTADO COM *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

Cuité/PB

2016

## ANEXO

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

N244i Nascimento, Maria Heloisa Alves.

logurte caprino sabor goiaba suplementado com oligofrutose e fermentado com *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico. / Maria Heloisa Alves Nascimento. – Cuité: CES, 2016.

44 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientadora: Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

1. Derivado lácteo. 2. logurte caprino. 3. Oligofrutose. I. Título.

Biblioteca do CES

CDU 637.1

MARIA HELOISA ALVES NASCIMENTO

IOGURTE CAPRINO SABOR GOIABA SUPLEMENTADO COM OLIGOFRUTOSE E  
FERMENTADO COM *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em \_\_ de \_\_\_\_ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira  
Universidade Federal de Campina Grande  
Orientadora

---

Profa. Msc. Carolina de Miranda Gondim  
Universidade Federal de Campina Grande  
Examinador

---

Nut. Dalyane Lais da Silva Dantas  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador

Cuité/PB  
2016

Dedico este trabalho a Deus, que mesmo diante de tantas dificuldades me permitiu realizar mais um sonho. À minha família, por todo o amor e apoio prestados a mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para ultrapassar todos os obstáculos que surgiram ao longo do curso e me proporcionar a realização deste sonho. Por ter me mostrado tantas vezes que eu não estava sozinha, por ter colocado em minha vida anjos, que foram essenciais nesses quatro anos de curso, nos quais pude confiar e apoiar-me. Obrigada, meu Deus!

Ao meu pai, José Mauricio, pelo esforço diário e pelas horas dedicadas ao trabalho exaustivo, objetivando dar a seus filhos tudo àquilo que não conseguiu ter. Crescer vendo-o trabalhar de domingo a domingo, sem tempo para se divertir ou até mesmo descansar como merecia, não foi fácil. Hoje entendo o porquê de todas as recusas feitas por ele durante todos esses anos e sou imensamente grata por tudo. Meu muito obrigada por todos os ensinamentos e sábios conselhos.

À minha mãe, Maria do Socorro, por todo o amor, paciência e apoio dedicados a mim ao longo da vida, principalmente por ter estado sempre ao meu lado a pesar da distância, por meio de ligações ou mensagens, mostrando-se sempre preocupada com sua cria. Meu muito obrigada por todos os ensinamentos e sábios conselhos.

Aos meus irmãos, Mauro Henrique e Ana Clara, que apesar das diferenças sempre estiveram ao meu lado, me ajudando sempre que precisei. Em especial a minha irmãzinha do coração por ser a primeira prova de amor incondicional que pude ter.

À minha avó, Maria José, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins, e ter ajudado na minha educação, me dando sempre confiança, forças, carinho e amor. Saiba que tenho um amor imenso pela senhora e sou muito grata por vibrar comigo a cada conquista e por estar sempre torcendo para o crescimento de sua Luluzinha.

Aos demais familiares, por me ajudarem, cada um ao seu modo, torcendo, orando, aconselhando, apoiando e principalmente vibrando a cada conquista. Em especial a minha tia, Maria das Neves, que nunca mediu esforços para ajudar ou conseguir algo para sua sobrinha amada; sei que sempre estive em suas orações e pensamentos. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao meu namorado, Mattheus Moab, por todas as horas de carinho, apoio e principalmente paciência. Por ter segurado minha mão e não me deixar cair sempre que eu pensei em desistir.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira, pela confiança e compreensão diante de tantos obstáculos para a finalização das análises. Por acreditar que eu era capaz de realizar todo o experimento. Pelos conselhos, apoio e preocupação com meu bem estar. Pela dedicação na nossa pesquisa, pelos valiosos ensinamentos e por toda disponibilidade de sempre. Que Deus me permita ser um terço da pessoa que és. A prova viva de um coração cheio de bondade, amor e companheirismo.

A todos os professores do Curso de Bacharelado em Nutrição da Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité-PB. Em especial a professora e mestre, Carolina de Miranda Gondim, pela confiança depositada em mim quando monitora de sua disciplina. Sou muito grata por toda ajuda e assistência prestada a mim.

Às minhas amigas e futuras colegas de profissão, Gislayne Silva, Miny Nóbrega e Natalia Fernandes, por todos os anos de convivência e amizade, dividindo comigo histórias, problemas, alegrias e me dando carinho, amor e apoio. Muito obrigada meninas pela amizade de vocês e pela força nas minhas análises, sem vocês não teria conseguido. Vocês são, sem dúvida, anjos em minha vida.

À família que Cuité me apresentou: Martiniano Lima, Carol Souza, Roberto Ferreira, Jociely Leite, Thamyres Morgana, Naryelle Rocha, Thalyta Maciel, Cathysia, Jackson Laurentino, Larissa Alves, Manoel Delmiro e todos os outros que aqui não citei.

À professora Carolina de Miranda Gondim e a nutricionista Dalyane Lais da Silva Dantas por participarem da minha banca examinadora, dividindo seus conhecimentos e contribuindo positivamente para o meu crescimento.

Enfim, meu muito obrigada a todas as pessoas que não foram citadas, porém não esquecidas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização do meu sonho.

**"Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas."**

**Steve Jobs**

## RESUMO

NASCIMENTO, M. H. A. **IOGURTE CAPRINO SABOR GOIABA SUPLEMENTADO COM OLIGOFRUTOSE E FERMENTADO COM *L. acidophilus*: avaliação *in vitro* de potencial probiótico.** 2016. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2016.

Neste estudo foi avaliada a sobrevivência da cultura *starter* composta por *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* e do probiótico *Lactobacillus acidophilus* na presença do prebiótico oligofrutose quando incorporados no iogurte caprino sabor goiaba e expostos às condições de digestão simuladas *in vitro*. Para tanto, foram processados 4 tipos de iogurtes caprinos, sendo T1 – o iogurte controle adicionado da cultura *starter* convencional (*Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*); T2, contendo o micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), além da cultura *starter*; T3, composto pelo prebiótico oligofrutose, além da cultura *starter* e T4, contendo o probiótico e o prebiótico associados (iogurte simbiótico), assim como a cultura *starter*. Os testes de potencial probiótico *in vitro* consistiram na avaliação do efeito de proteção da matriz constituída pelo iogurte e da ação estimulante da fibra prebiótica sobre a viabilidade das bactérias probióticas testadas frente às condições gastrointestinais simuladas: boca (solução de saliva artificial), esôfago-estômago (suco gástrico artificial), duodeno (suco intestinal artificial) e íleo, após 7 dias de armazenamento refrigerado. A partir dos resultados constatou-se que o iogurte controle adicionado da cultura *starter* quando exposto ou não exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal apresentaram contagens abaixo do preconizado para este tipo de produto e quando adicionados do prebiótico oligofrutose, percebeu-se um aumento dessas contagens, sugerindo que a oligofrutose estimulou o crescimento da cultura *starter* estimulando a viabilidade destes micro-organismos no iogurte mesmo exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal. Todavia, no iogurte adicionado do probiótico *L. acidophilus* (LA-5) na presença ou não da oligofrutose, observou-se uma tendência de queda das contagens deste micro-organismo, sugerindo que o prebiótico não protegeu tanto a estirpe estudada. Reforça-se que ao final da digestão, muito embora a bactéria probiótica testada no iogurte, tanto na ausência como na presença da oligofrutose, tenha alcançado o intestino em quantidades abaixo do recomendado, essas contagens são suficientes para aderir à parede intestinal, colonizar o intestino com eficácia e desta forma exercer suas atividades biológicas, demonstrando-se assim como um produto com potencial probiótico e veículo para carrear tanto a bactéria láctica estudada como o ingrediente prebiótico em questão.

**Palavras-chave:** micro-organismos probióticos, prebiótico, condições gastrointestinais.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, M. H. A. **GOAT YOGURT FLAVOR GUAVA SUPPLEMENTED WITH OLIGOFRUCTOSE AND FERMENTED WITH *L. acidophilus*: *in vitro* evaluation of the potential probiotic.** 2016. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2016.

We evaluated the survival of the *starter* culture *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* and of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* in the presence of the prebiotic oligofructose when incorporated in the goat yogurt flavor guava and exposed to digestion conditions simulated *in vitro*. Therefore, they were processed 4 types of goat yogurt, and T1 - the yogurt added control of conventional starter culture (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*); T2 containing the probiotic microorganism *Lactobacillus acidophilus* (AT-5) in addition to the starter culture; T3 composed of oligofructose prebiotic, besides the starter culture and T4 containing the probiotic and prebiotic associated (symbiotic yogurt), as well as the starter culture. Potential tests probiotic *in vitro* consisted in evaluating the protective effect of the matrix comprising the yogurt and stimulating action of prebiotic fiber on the viability of probiotic bacteria tested against the simulated gastrointestinal conditions: mouth (artificial saliva), esophagus, stomach (artificial gastric juice), duodenum (artificial intestinal juice) and ileum after 7 days of refrigerated storage. From the results it was found that the yogurt control added of the *starter* culture when exposed or not exposed to simulated conditions of the gastrointestinal tract showed counts below the recommended for this type of product and when added to the oligofructose prebiotic, it was noticed an increase in these scores suggesting that oligofructose stimulated growth of the *starter* culture stimulating the viability of micro-organisms in yogurt even when exposed to the conditions simulated in the gastrointestinal tract. However, added probiotic *L. acidophilus* yogurt (LA-5) in the presence or not of oligofructose, there was a downward trend in counts of this micro-organism, suggesting that the prebiotic did not protect both studied strain. It is stressed that the end of the digestion, although the probiotic bacteria tested in yoghurt, both in the absence and in the presence of oligofructose, have reached the intestine in amounts lower than recommended, these counts are sufficient to adhere to the intestinal wall, colonize the intestine effectively and thus exert their biological activities, demonstrating as well as a product with probiotic potential and vehicle for carrying both lactic bacteria studied as the prebiotic ingredient in question.

**Keywords:** probiotic microorganism, prebiotic, gastrointestinal conditions.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de processamento de 100g da geleia de goiaba.....	23
<b>Figura 2</b> – Fluxograma de processamento dos diferentes tipos de iogurtes caprinos sabor goiaba.....	24
<b>Figura 3</b> – Número de células viáveis das amostras.....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Condições de processamento a ser utilizadas em cada etapa de digestão simulada.....	26
<b>Tabela 2</b> - Amostras obtidas no final da digestão experimental.....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS.....	16
3.2 LEITE CAPRINO.....	19
3.3 LEITES FERMENTADOS: IOGURTE.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....	22
4.2 LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRA.....	22
4.2.1 Local.....	22
4.2.2 Coleta dos materiais.....	22
4.2.3 Amostras.....	22
4.2.4 Elaboração da geleia de goiaba.....	23
4.2.5 Elaboração do iogurte caprino.....	23
4.3 TESTES <i>IN VITRO</i> DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DOS IOGURTES CAPRINOS.....	25
4.3.1 Avaliação da sobrevivência das bactérias em condições gastrointestinais simuladas.....	25
4.3.1.1 Inoculação das matrizes de iogurtes.....	25
4.3.1.2 Simulação das condições gastrointestinais.....	25
4.3.1.3 Análises microbiológicas.....	27
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	34
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35

# 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Nordeste do Brasil apresenta obstáculos que dificultam, sobremaneira, a sustentabilidade desse segmento, principalmente aqueles vinculados à pequena produção. Tal fato decorre, principalmente, da pouca eficiência dos atuais sistemas de produção praticados, bem como, da inexistência de tecnologias de processamento dos produtos derivados, da forma ineficaz de gerenciamento da atividade, da insuficiente capacitação e da pouca organização dos produtores (GASPAR et al., 2011).

As perspectivas para os pequenos e médios produtores rurais com menor nível de instrução, que utilizam baixo nível de tecnologia, apontam para um quadro de dificuldades crescentes, que se não alterado, pode conduzir a sua extinção. Por esta razão, as diferentes estâncias governamentais vêm planejando e colocando em prática diversas estratégias para recuperar e soerguer a economia regional, através da geração de tecnologias e capacitação dos produtores rurais. No que concerne a caprinocultura leiteira, são imprescindíveis pesquisas direcionadas aos aspectos de manejo do rebanho; melhoria da qualidade do leite produzido; e elaboração de estratégias de melhoria do beneficiamento e acondicionamento dos produtos derivados.

O leite de cabra destaca-se por apresentar elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas; caseína e albumina; gordura insaturada; sais minerais e vitaminas; em soma a presença de fermentos lácticos, os quais apresentam propriedades favoráveis à digestão, bem como para defesa do trato gastrointestinal contra a ação de bactérias patogênicas (HAENLEIN, 2004). A partir do leite caprino podem ser obtidos produtos como queijos, iogurtes e bebidas lácteas, utilizando-se de processos simples e acessíveis aos pequenos produtores, sendo essa uma alternativa para o aumento no consumo de produtos de origem caprina e para a agregação de valor a tais produtos (SANTOS et al., 2011).

Dentre os derivados lácteos, o leite fermentado é resultante do processo de fermentação láctica, adicionado ou não de frutas, açúcar e outros ingredientes que melhorem sua apresentação e modifiquem seu sabor. O leite fermentado mais importante economicamente é o iogurte, obtido da coagulação do leite pela ação de dois micro-organismos, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*, que favorecem uma melhor assimilação, pelo organismo humano, de certos componentes, principalmente a lactose e proteínas (BOBBIO, 1995).

Assim como o iogurte, muitos alimentos exercem papel importante no funcionamento do organismo dos seres humanos, sendo chamados atualmente de alimentos funcionais. Sanders (1998) preconiza que são considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças.

Segundo Ziemer e Gibson (1998), a suplementação com componentes de atividade reconhecidamente benéfica à saúde, como cálcio e vitaminas, constituíam os alimentos funcionais de primeira geração. Nos últimos anos, por outro lado, esse conceito voltou-se principalmente para aditivos alimentares, que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos são atualmente os aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais.

As fibras alimentares auxiliam no funcionamento do intestino. No Brasil, esta alegação pode ser utilizada para fibras solúveis e insolúveis desde que a porção diária forneça no mínimo 1,5 g por 100 mL, se o alimento for líquido, e 3 g de fibras no alimento sólido (ANVISA, 2008). A fibra solúvel não é digerida no estômago ou no intestino delgado e tem um papel importante na prevenção de doenças como hipercolesterolemia, obesidade e diabetes (GOLDBERG, 1994; SPILLER, 2001). Os prebióticos inulina, oligofrutose e frutooligosacarídeos (FOS) são fibras solúveis que não alteram o valor calórico dos produtos, podem reduzir o índice glicêmico de alguns alimentos, são potencialmente capazes de melhorar a absorção de cálcio, ferro e magnésio. Além disso, servem como substrato para micro-organismos benéficos (probióticos).

A exigência por alimentos com composição nutricional equilibrada e que possam oferecer benefícios adicionais à saúde é manifestada pelos consumidores atuais e, dentro deste contexto, os alimentos com potencial probiótico ganham cada vez mais a atenção do consumidor (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013). Em virtude desta procura, o mercado de laticínios probióticos tem crescido rapidamente em todo o mundo e continua em plena expansão.

A definição aceita internacionalmente para probióticos refere-se a micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Para que possam proporcionar os efeitos benéficos, esses micro-organismos devem sobreviver ao longo do trato gastrointestinal, tolerando o ácido, bile e enzimas gástricas e, em seguida, aderir e colonizar o epitélio intestinal (HUANG; ADAMS, 2004). Desta forma, as propriedades funcionais dos probióticos podem ser influenciadas pela

matriz alimentar utilizada como transportadora destas cepas, a qual poderá trazer um efeito protetor destes micro-organismos até que os mesmos possam atingir o trato intestinal em contagens viáveis e, assim, mediar os seus efeitos benéficos para o consumidor (OUWEHAND et al., 2001).

Destaca-se que produtos que contêm uma combinação sinérgica de micro-organismos probióticos e substâncias prebióticas são denominados “simbióticos”. Tais combinações podem apresentar vantagens tecnológicas e fisiológicas na medida em que possibilitam uma melhor viabilidade da cultura probiótica no produto e por estimularem o crescimento destas culturas no trato gastrointestinal do consumidor.

A utilização conjunta de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. tem sido estudada em leites e bebidas fermentadas (CASTRO et al., 2013) e queijos variados (GOMES et al., 2011). Ressalta-se, que tais estudos enfatizam principalmente a tecnologia de fabricação de iogurtes obtidos a partir de leite bovino, bem como os efeitos das culturas lácticas nas características destes produtos, havendo poucos estudos direcionados ao papel protetor do iogurte simbiótico na sobrevivência das bactérias ácido lácticas em condições similares àsquelas encontradas no trato gastrointestinal de humanos.

Assim, diante das boas perspectivas da utilização do iogurte como veículo probiótico, o desenvolvimento do iogurte caprino simbiótico apresenta-se como alternativa de obtenção de um alimento funcional e nutritivo, atendendo aos anseios da população por alimentos que promovam saúde, além da nutrição, já que reforçam os mecanismos naturais de defesa do ser humano, e direciona para as perspectivas de um incremento ainda maior nas vendas de iogurte, devido ao valor agregado, o que justifica a importância de um estudo mais detalhado para elaboração do referido produto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar iogurte caprino sabor goiaba, utilizando cultura iniciadora (*Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*), *Lactobacillus acidophilus* como micro-organismo probiótico e oligofrutose como ingrediente prebiótico e avaliar o potencial probiótico deste produto *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Elaborar diferentes iogurtes caprinos adicionados de cultura iniciadora (*Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*), *Lactobacillus acidophilus* como micro-organismo probiótico e oligofrutose como ingrediente prebiótico;

✓ Analisar a sobrevivência das bactérias probióticas adicionadas ao iogurte caprino quando expostas às condições simuladas do trato gastrointestinal;

✓ Avaliar a influência da matriz alimentar e da fibra prebiótica frente a sobrevivência destes micro-organismos probióticos durante a travessia das condições simuladas do trato gastrointestinal.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

Alimento funcional é definido pela resolução n 18/99, como sendo "aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (BRASIL, 1999a).

Naturalmente, todos os alimentos são funcionais, uma vez que nos proporcionam sabor, aroma e valor nutritivo. Entretanto, nas últimas décadas, o termo funcional está sendo aplicado a alimentos com uma característica diferente, a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além das qualidades nutricionais básicas encontradas. Tais alimentos também são vistos como promotores de saúde e podem estar associados à redução ao risco a certas doenças (VO; KIM, 2013). Com a grande divulgação dos benefícios destes alimentos a população cada vez mais preocupada com a saúde vem buscando uma alimentação saudável, levando as indústrias a investirem cada vez mais neste segmento.

Os alimentos funcionais constituem hoje prioridade de pesquisa em todo mundo com a finalidade de elucidar as propriedades e os efeitos que estes produtos podem apresentar na promoção da saúde. Estes insumos são classificados variando quanto a sua fonte de origem, sendo vegetal ou animal, e quanto aos benefícios causados pelos princípios ativos adicionados aos alimentos para quem os consomem. Podem atuar em seis áreas do nosso organismo: no sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento, na diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA, 2003).

Dentre os alimentos funcionais, merece destaque os probióticos, cujo termo é de origem grega e significa 'para a vida', e tem sido empregado das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos. Tal termo foi inicialmente proposto como descritivo de compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano (LILLY; STILLWELL, 1965). Posteriormente, Parker (1974) definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal.

Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 90, o interesse por micro-organismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos. (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

Além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual forem adicionados, os probióticos fazem parte dos micro-organismos capazes de exercer efeitos que irão beneficiar o hospedeiro. Sabe-se que os mesmos exercem influências significativas sobre sintomas clínicos de determinadas doenças como a alergia alimentar infantil. Estudos clínicos demonstraram que as cepas consideradas probióticas são capazes de sobreviver ao processo digestivo, sendo algumas delas capazes de aderir à mucosa intestinal. Foi observado que a ingestão de probióticos resulta em melhoria da qualidade de vida de indivíduos com doenças crônicas mediadas pelo sistema imunológico, como as doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa).

Fuller (1989) enumerou três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis mediante produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. Segundo Naidu e Clemens (2000), o espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos.

Os alvos de estudo mais comuns na avaliação do valor nutritivo de stirpes probióticas são os laticínios fermentados por lactobacilos e bifidobactérias. Tais produtos contêm um elevado teor de nutrientes, que variam com o tipo de leite utilizado, o tipo de micro-organismo adicionado e o processo de fabrico escolhido.

O campo para o desenvolvimento de tecnologias envolvendo o emprego de culturas probióticas é deveras promissor e requer inúmeros estudos, a fim de que se possa estabelecer definitivamente o mecanismo de ação dessas culturas e os veículos apropriados para que essas culturas atinjam o intestino em concentrações efetivas e de maneira a exercer o seu efeito apropriadamente. Em geral, pode-se dizer que o processamento de alimentos funcionais contendo bactérias probióticas, principalmente sua incorporação em leites fermentados e queijos, vem resultando em produtos com alto grau de aceitabilidade, nos quais a sua viabilidade e funcionalidade são mantidas.

Sendo classificados como ingrediente funcional em alimentos, além dos probióticos destacam-se os prebióticos. O termo prebiótico foi introduzido em 1995 por Gibson e Roberfroid (FERREIRA; TESHIMA, 2000) e passou a englobar os componentes alimentares não digeríveis, geralmente oligossacarídeos, com atividade bifidogênica, ou seja, capazes de

estimular o crescimento e/ou atividade de algumas bactérias presentes no intestino, afetando benéficamente o hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; NOMOTO, 2005).

Suas principais características são a capacidade de não sofrer hidrólise ou absorção no intestino delgado e promoção da alteração da microflora intestinal por uma saudável. Dentre os prebióticos, destacam-se a oligofrutose, a inulina e os frutooligosacarídeos (FOS) (SAAD, 2006).

A oligofrutose e a inulina pertencem à classe de carboidratos frutanos (oligo ou polissacarídeos de origem vegetal, com estrutura linear ou ramificada e que apresentam uma ou mais ligações frutossil – frutose predominante dentre as ligações glicosídicas). São fibras solúveis fermentáveis, não digeríveis pela alfa amilase nem pelas enzimas hidrolíticas (maltase, sacarase) que contribuem para o equilíbrio da flora intestinal, cujo consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis. Dentre suas principais funções, destacam-se a modulação hormonal (balanço na produção de insulina e glucagon), produção de peptídeos gastrintestinais e equilíbrio do metabolismo de macronutrientes (SAAD, 2006).

A oligofrutose é uma fibra alimentar solúvel, composta de oligômeros de cadeias curtas, possui propriedades similares às do açúcar e de xaropes de glicose, apresentando 30 a 50% do poder adoçante e maior solubilidade que o açúcar. Sendo assim, esse frutano é frequentemente empregado em conjunto com edulcorantes de alto poder adoçante, para substituir o açúcar, resultando em um perfil adoçante bem balanceado. A oligofrutose também é utilizada no sentido de conferir consistência a produtos lácteos, maciez a produtos de panificação, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, conferir crocância a biscoitos com baixo teor de gordura e, além disso, substituir o açúcar também no sentido de atuar como ligante em barras de cereais (KAUR; GUPTA, 2002).

Esse prebiótico não é considerado um carboidrato, nem fonte de energia, podendo ser usado de modo seguro por diabéticos (MOLIS et al., 1996; ROBERFROID, 2000). A oligofrutose não cristaliza, não precipita e nem deixa a sensação de secura ou areiosidade na boca, sendo sua viscosidade comparável também à da sacarose. Quanto à estabilidade, a oligofrutose não é degradada pela maioria dos processos térmicos empregados pela indústria alimentícia, podendo ser utilizada desde temperaturas de refrigeração até 140 °C. Por não ser redutora, a oligofrutose não sofre reação de Maillard, bem como suporta pH maiores do que 3,0 (BORNET, 1994; YUN, 1996; NITSCHKE; UMBELINO, 2002). Ainda estabiliza espumas, melhora a textura e o sabor de produtos (ROBERFROID, 2000).

Devido ao potencial sinérgico entre probióticos e prebióticos, a combinação destes ingredientes é definida como simbiótico, a qual beneficia o hospedeiro devido ao aumento da sobrevivência e implantação dos microrganismos vivos no sistema gastrointestinal (COLLINS; GIBSON, 1999; REIG; ANESTO, 2002; CASIRAGHI et al., 2007). No entanto, no desenvolvimento de simbióticos é necessária a seleção de microrganismos probióticos que venham melhor utilizar este prebiótico (MORAL; MORENO-ALIAGA; HERNÁNDEZ, 2003). Segundo Martínez-Villaluenga et al., (2006) a interação entre probióticos e prebióticos *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico no alimento antes do seu consumo. Fooks, Füller e Gibson (1999) e Chen e Walker (2005) afirmam que os FOS tendem a estimular o crescimento de bifidobactérias e bactérias ácido-láticas no intestino humano. De acordo com Rastall e Maitin (2002), o desenvolvimento de produtos simbióticos tem sido considerado promissor na área de alimentos funcionais.

### 3.2 LEITE CAPRINO

A legislação brasileira define leite de cabra como “produto normal, fresco e integral, obtido da ordenha completa e ininterrupta de animais sadios, bem alimentados e em repouso” (BRASIL, 1999b).

Dentre os vários tipos de leite, o caprino destaca-se por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas, caseína e albumina, necessárias à constituição dos tecidos e sangue; gordura insaturada, que contribui para circulação sanguínea; sais minerais, necessários para a formação do esqueleto; e ainda, vitaminas e fermentos lácticos, sendo estes últimos favoráveis à digestão e capazes de exercer ação de defesa frente à ação de bactérias patogênicas a nível intestinal (HAENLEIN, 2004).

A qualidade nutricional do leite de cabra está relacionada à sua composição química, sendo constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, ressaltando-se também o seu conteúdo mineral. Entre os ácidos graxos, destaca-se o ácido linoléico conjugado (CLA), sendo considerado componente nutracêutico da gordura do leite, por apresentar atividades anticarcinogênica e antiteratogênica; habilidade para redução de efeitos catabólicos da estimulação imune; redução de reservas corporais de gordura, e ainda, promoção de crescimento. Atua, também, sobre os efeitos secundários da obesidade e da diabetes (OSMARI et al., 2011). Logo, a importância do leite de cabra na alimentação se deve ao seu alto valor nutritivo, maior digestibilidade e as características terapêuticas e dietéticas (HAENLEIN, 2004).

Os teores de vitaminas no leite de cabra, comparado ao leite bovino, são próximos, exceto as vitaminas B6, B12 e ácido fólico que são reduzidos. Fisiologicamente as cabras convertem todo caroteno em vitamina A, portanto, o leite apresenta maior teor dessa vitamina. Ainda, apresenta maior quantidade de cálcio, potássio, magnésio, fósforo, cloro e manganês e menor teor de sódio, ferro, zinco, enxofre, molibdênio e cobalto, estando esse último relacionado com a taxa reduzida de vitamina B12 (FISBERG, 1999).

A boa digestibilidade e aceitabilidade do leite de cabra são importantes no momento de se formular dietas para crianças e pessoas convalescentes. A importância do leite de cabra na alimentação infantil não reside apenas no valor biológico de seus nutrientes, mas também em suas características de hipoalergenicidade. Isto vem aumentando gradativamente o seu consumo nos processos alérgicos de origem alimentar, particularmente aqueles relacionados às proteínas do leite de vaca. De acordo com Jardim (1984) e Medeiros et al. (1994), o leite de cabra é o alimento ideal para crianças, pessoas idosas, doentes e convalescentes, pois além de ter boa composição nutricional, não provoca o aparecimento de cólicas estomacais, podendo mesmo, em alguns casos, eliminá-las. Também é recomendado para crianças alérgicas ao leite de vaca e a pessoas que fazem tratamento quimioterápico, porque pode diminuir a queda de cabelos, que ocorre com este tipo de tratamento.

### 3.3 LEITES FERMENTADOS: IOGURTE

Os leites fermentados foram originados há cerca de 10 a 15 mil anos quando os povos nômades começaram a domesticar os animais e consumir seus produtos (FERREIRA, 2005; TAMINE; ROBINSON, 2000). O leite era armazenado em recipientes de cerâmica e de couro de animais e fermentava em decorrência da flora láctea que chegava acidentalmente após a ordenha e encontrava temperatura favorável a seu desenvolvimento (PEREDA, 2005). Com o passar do tempo, os micro-organismos foram sendo selecionados possibilitando a origem de produtos lácteos diferenciados com características agradáveis.

Quanto ao local de origem do iogurte, existem controvérsias. Ferreira (2005) relata que para uns, sua origem se deu na Ásia com pastores turcos, e para outros é originário dos Balcãs. Segundo Pereda (2005), sua origem situa-se no Oriente Médio ou na Índia.

No início do século XX, a teoria de Metchnikoff, denominada “Teoria da Longevidade”, atribuiu ao iogurte vários efeitos benéficos à saúde humana. Para Metchnikoff, a longevidade dos povos dos Balcãs era resultado de uma dieta rica em leite fermentado, contendo um lactobacilo que por muito tempo foi considerado como *L. bulgaricus*.

Posteriormente, verificou-se que o *L. acidophilus* deveria ser o microrganismo contido em tais produtos pela afinidade deste com o trato intestinal humano. Embora esta teoria tenha exagerado no valor do iogurte, influenciou de forma significativa na difusão em vários países da Europa (RASIC; KURMANN, 1978; TAMIME; ROBINSON, 2000; FERREIRA, 1997).

Relatos históricos mostram que a acidificação é um dos métodos mais antigos de preservação do leite. O leite fermentado surgiu na Mesopotâmia a cerca de 5000 a.C. O iogurte é um alimento e bebida tradicional nos Bálcãs e na Ásia Mediterrânea e a palavra “iogurte” é derivada da palavra turca “jugurt”, sendo conhecida por uma variedade de nomes em diferentes países (TAMIME; DEETH, 1980).

O iogurte é provavelmente o leite fermentado mais popular e de maior importância econômica (TAMIME; ROBINSON, 2000). É o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, realizada com cultivos proto-simbióticos de *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2000).

Constitui uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, vitaminas e carboidratos. O consumo deste produto está relacionado à imagem positiva de alimento saudável e nutritivo, associado a suas propriedades sensoriais. Esse consumo também pode ser atribuído aos benefícios que o iogurte traz ao organismo humano, tais como: facilitar a ação das proteínas e enzimas digestivas, facilitar a absorção de cálcio, fósforo e ferro, ser fonte de galactose – importante na síntese de tecidos nervosos e cerebrosídeos em crianças, além de ser uma forma indireta de se ingerir o leite (FERREIRA et al., 2001).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Tratou-se de uma pesquisa de laboratório de caráter experimental com intuito de elaborar o iogurte caprino sabor goiaba.

A experimentação pode ser definida como conjunto de procedimentos estabelecidos para a verificação da hipótese. É sempre realizada em situações de laboratório, isto é, com o controle de circunstâncias e variáveis que possam inferir na relação de causa e efeito que esta sendo estudada (BARROS; LEHFELD, 2000).

### 4.2 LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRA

#### 4.2.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande - *campus* Cuité.

#### 4.2.2 Coleta dos materiais

O leite de cabra da raça Toggenburg pasteurizado, foi adquirido de um pequeno produtor da cidade de Nova Floresta/PB. O leite foi transportado em um recipiente previamente limpo e reservado unicamente para seu transporte até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos, onde foi elaborado o iogurte caprino sabor goiaba. As culturas lácticas utilizadas na produção dos iogurtes foram disponibilizadas pela Christian Hansen<sup>®</sup> (Valinhos, Minas Gerais, Brasil) e a fibra prebiótica oligofrutose (FOS) pela Orafti<sup>®</sup> P95. Os demais ingredientes como açúcar refinado e goiaba foram adquiridos em redes de supermercados da cidade de Cuité/PB.

#### 4.2.3 Amostras

Foram processados quatro diferentes tipos de iogurtes caprinos sabor goiaba, em 3 experimentos, a citar: T1 (Iogurte Controle), contendo a cultura convencional *starter* composta por *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* (DVS YC-X11); T2 (Iogurte Probiótico), contendo o micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), além da cultura *starter*; T3 (Iogurte Probiótico), composto

pelo prebiótico oligofrutose, além da cultura *starter* e T4 (Iogurte Simbiótico), contendo o micro-organismo probiótico e a fibra prebiótica associados.

#### 4.2.4 Elaboração da geleia de goiaba

Para elaboração da geleia extra de goiaba, utilizou-se a proporção 50:50 (goiaba:açúcar), acrescentando-se 40% de água. Para tanto, a fruta batida em liquidificador com água, foi peneirada, e o suco acrescentado de açúcar foi levado ao fogo baixo ( $\pm 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A verificação do ponto de geleia realizou-se com base no teor de sólidos solúveis, que segundo a legislação específica, deve ser no mínimo 62% (BRASIL, 1979).

O processo de elaboração das geleias de frutas está descrito no fluxograma apresentado na Figura 1.

**Figura 1** - Fluxograma de processamento de 100g da geleia de goiaba.



#### 4.2.5 Elaboração do iogurte caprino

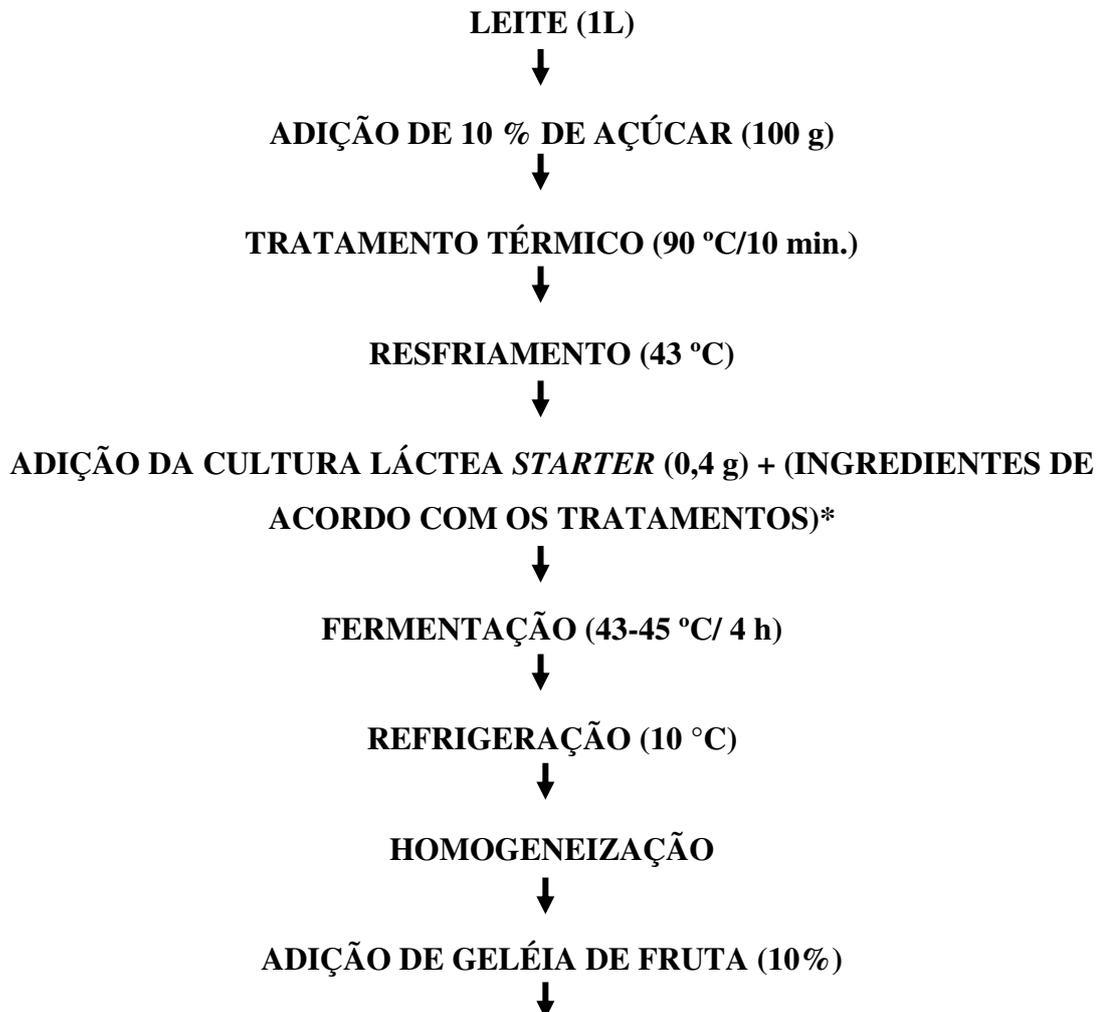
Para a elaboração de 1L de iogurte, a mistura leite de cabra pasteurizado pelo fornecedor e açúcar refinado (10% - m/v) sofreu tratamento térmico a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), por 10 minutos. Após esfriamento a  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), essa mistura recebeu a adição da cultura láctica *starter*, composta por *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* (400 mg). Os demais tratamentos foram feitos da seguinte forma: o Tratamento 2, além da cultura láctica *starter*, foi adicionado de 100 mg do micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (LA-5); o Tratamento 3 foi adicionado de 3,4% da fibra prebiótica

oligofrutose, juntamente com a cultura láctica *starter* e o Tratamento 4 foi adicionado tanto da cultura láctica *starter*, como dos (LA-5) e da fibra prebiótica oligofrutose nas mesmas quantidades referidas acima. A mistura foi fermentada a 43 °C ( $\pm 2$  °C)/4 h em estufa estabilizada.

O ponto final da fermentação do iogurte foi dado com base na verificação da firmeza do coágulo e determinação da acidez em ácido láctico, que atingiu no máximo 1,5%. Estes iogurtes, posteriormente, foram resfriados a 10 °C ( $\pm 1$  °C). Em seguida, homogeneizou-se com bastão de vidro o produto para quebra do coágulo e foi acrescida a geleia de goiaba numa concentração de 10% (m/v). Os produtos foram acondicionados em garrafas plásticas de polietileno de alta densidade e estocados a 10 °C ( $\pm 1$  °C), até a realização das análises.

O processo de elaboração de 1L de iogurte com posterior adição de geleia de goiaba esta descrito no fluxograma apresentado na Figura 2.

**Figura 2** – Fluxograma de processamento dos diferentes tipos de iogurtes caprinos sabor goiaba.



## IOGURTE CAPRINO SABOR GOIABA

\*TRATAMENTO 1 – MICRO-ORGANISMO *STARTER* (0,4 g)

\*TRATAMENTO 2 - MICRO-ORGANISMO *STARTER* (0,4 g) + *L. acidophilus* (0,1 g)

\*TRATAMENTO 3 - MICRO-ORGANISMO *STARTER* (0,4 g) + Oligofrutose (34 g)

\*TRATAMENTO 4 - MICRO-ORGANISMO *STARTER* (0,4 g) + *L. acidophilus* (0,1 g) + Oligofrutose (34 g)

### 4.3 TESTES *IN VITRO* DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DOS IOGURTES CAPRINOS

Esses testes consistiram na avaliação do efeito protetor dos diferentes iogurtes caprinos elaborados sobre a sobrevivência das bactérias lácticas *starter* e probiótica adicionada aos mesmos (de acordo com os tratamentos já descritos), quando expostas às condições simuladas do trato gastrointestinal.

#### 4.3.1 Avaliação da sobrevivência das bactérias em condições gastrointestinais simuladas

Após processamento dos iogurtes conforme metodologia descrita anteriormente, e armazenamento por 7 dias sob temperatura de refrigeração ( $10 \pm 1$  °C), se procedeu da seguinte forma:

##### 4.3.1.1 Inoculação das matrizes de iogurtes

Para cada iogurte processado, um conjunto de cinco amostras rotuladas como C1, C2, C3, S1 e S2 foram produzidas. C1 e C2 foram identificados como os iogurtes controles duplicados, que foram os diferentes tipos de iogurtes elaborados, mas não foram expostos às condições simuladas gastrointestinais; C3 foi tido como um iogurte controle exposto às condições simuladas gastrointestinais (usado para realizar assepticamente os ajustamentos de pH na etapas sequenciais da digestão simulada). S1 e S2 representaram os iogurtes processados e expostos às condições simuladas gastrointestinais. Todas as amostras acima mencionadas foram preparadas em frascos estéreis de 50 mL. Nestes recipientes, os iogurtes foram distribuídos em quantidades de 25 g cada.

##### 4.3.1.2 Simulação das condições gastrointestinais

A via gastrointestinal utilizada está descrita na Tabela 1, incluindo os compostos e concentrações utilizadas, o tempo de exposição e as intensidades de agitação em todas as etapas. As agitações foram utilizadas para simular os movimentos peristálticos.

**Tabela 1** - Condições de processamento a ser utilizadas em cada etapa de digestão simulada.

Compartimento	Condição	Agitação (rpm)	pH final	Tempo (min)
Boca	Saliva	200	6,9	2
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30
Íleo	-----	45	6,5	60

A mastigação foi simulada de acordo com Hold et al. (1995) e Choi et al. (2007), utilizando uma solução de saliva preparada com 100 U/mL de 1- $\alpha$ -amilase diluída em solução de CaCl<sub>2</sub> a 1 mM, onde o pH foi ajustado para 6,9 utilizando solução de NaHCO<sub>3</sub> a 1 mM. Esta solução foi adicionada em 25 g das amostras a uma taxa de 0,6 mL/min, durante 2 minutos. Na etapa que simula as condições do esôfago-estômago foi adicionada solução de pepsina a uma taxa de 0,05 mL/mL, durante 90 minutos. A solução de pepsina foi preparada em HCl a 0,1 N numa proporção de 25 mg/mL. Nesta etapa, o pH foi reduzido para 2, utilizando solução de HCl a 1 M (MAINVILLE; ARCAND; FARNWORTH, 2005). As condições do duodeno foram simuladas utilizando 2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares, diluídos em solução de NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 M. Esta solução foi adicionada no início da etapa a uma taxa de 0,25 mL/mL (LAURENT; BESANÇON; CAPORICCIO, 2007). Finalmente, a etapa do íleo foi provocada por um aumento do pH para 6,5 utilizando solução de NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 M. A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho total aumentou (como acontece durante uma digestão real).

Todas as soluções das enzimas foram preparadas em frascos e esterilizadas por filtração, usando membrana filtrante de 0,22  $\mu$ m (Milipore, Billerica MA, USA) antes de

serem utilizadas. Após esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação. Uma câmara de incubação a 37 °C e agitação mecânica foi usada para simular a temperatura do corpo humano os movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo.

#### 4.3.1.3 Análises microbiológicas

As contagens das células viáveis de bactérias lácticas (sendo tanto a cepa *starter* como a probiótica) adicionadas aos iogurtes expostos a cada condição gastrointestinal simulada foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram semeadas, posteriormente, conforme método proposto por Miles, Misra e Irwin (1938). Para a contagem de *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*, realizou-se o plaqueamento em ágar MRS (Sigma-Aldrich), seguida de incubação sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h; enquanto que *L. acidophilus* foi semeado em placas com ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL), 5 mL de soluções estoque de dicloxacilina e 10 mL de solução estoque de cloreto de lítio e incubado sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h. Os resultados foram expressos como o log das unidades formadoras de colônias por cada grama de iogurte (log de UFC/g). O pH de cada amostra foi medido em cada etapa de simulação das condições gastrintestinais com um medidor de pH (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), que foi periodicamente esterilizado com etanol (90 mL/100 mL).

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

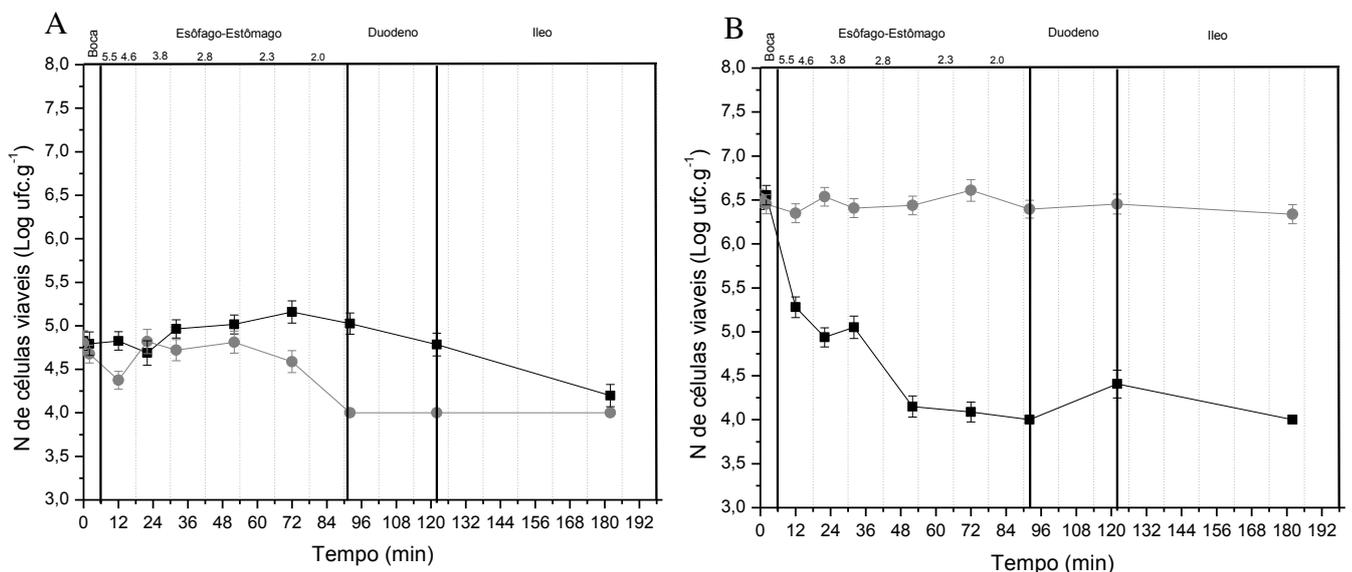
Os resultados dos testes *in vitro* da avaliação do potencial probiótico dos iogurtes elaborados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Para o cálculo dos dados, utilizou-se o programa - Statistics Analy Systems, versão 8.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC.) (SAS, 1999).

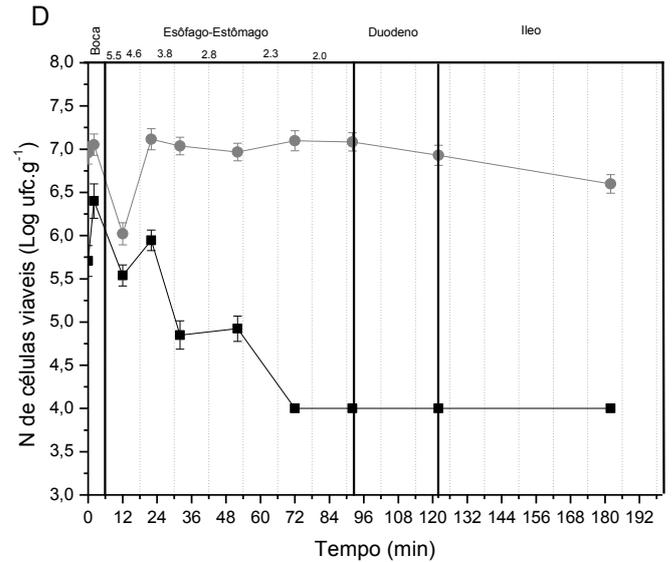
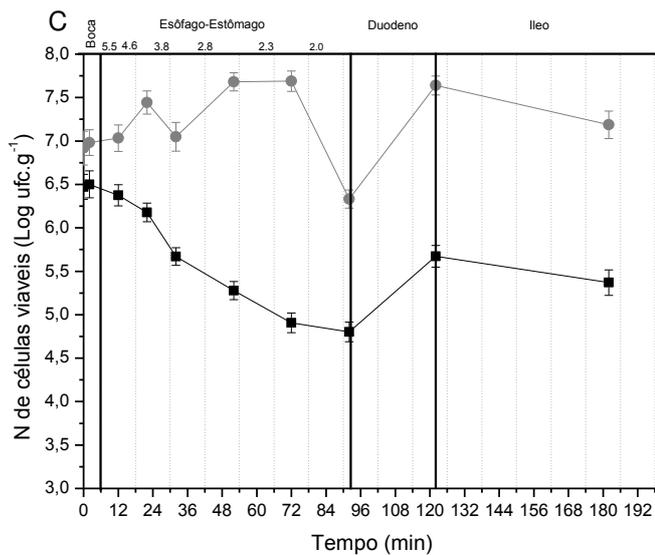
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para proporcionar efeitos benéficos à saúde para o animal hospedeiro, as bactérias probióticas ingerida por via oral devem sobreviver ao longo do trato gastrointestinal, tolerando ácido, biliar e enzimas gástricas, e, em seguida, mostrar a sua viabilidade e a atividade no local de ação (DING; SHAH, 2007; HUANG; ADAMS, 2004). Sendo assim, a capacidade de tolerar estresse digestivo é uma das propriedades importantes para que um micro-organismo possa ser adicionado em alimentos (ROSS et al., 2005). O experimento realizado neste estudo foi baseado no modelo gastrointestinal utilizado para testar a sobrevivência *in vitro* de bactérias em diferentes condições que imitam a digestão de alimentos semissólidos (MADUREIRA et al., 2011), incluindo a passagem do alimento através de todos os compartimentos do trato gastrointestinal (da boca ao íleo), simulação mecânica (isto é, através de movimentos peristálticos com agitação real) e exposição a um gradiente de pH (como ocorre normalmente durante a digestão).

As contagens de células viáveis da cultura *starter* composta por *Streptococcus thermophilus* e por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (DVS YC-X11) presentes no iogurte controle (T1); da bactéria láctica probiótica *L. acidophilus* (LA - 5) no iogurte probiótico (T2); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na presença do prebiótico oligofrutose no iogurte prebiótico (T3) e do probiótico *L. acidophilus* na presença do prebiótico oligofrutose no iogurte simbiótico (T4), quando exposto e não exposto às condições simuladas do trato gastrintestinal (TGI), podem ser observadas na Figura 3.

**Figura 3** - Número de células viáveis (média  $\pm$  desvio padrão) de (A) *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (DVS YC-X11 – Iogurte Controle), (B) *Lactobacillus acidophilus* (LA-5 – Iogurte probiótico), (C) *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na presença de oligofrutose (Iogurte prebiótico) e (D) *Lactobacillus acidophilus* associado a oligofrutose (Iogurte simbiótico) quando expostos (■) e não expostos (●) às condições simuladas do trato gastrointestinal em diferentes tempos de incubação. Os valores de pH que as bactérias foram expostas estão indicados no canto superior esquerdo do gráfico.





Houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas contagens obtidas para as bactérias lácticas *starter* e probiótica, quando expostas e não expostas (controle) às condições simuladas do trato gastrointestinal, tanto na presença como na ausência do prebiótico oligofrutose.

Quando adicionada ao iogurte e não exposta às condições simuladas do trato gastrointestinal, a cultura *starter* apresentou contagens que variaram de 4 a 4,82 log UFC/g, valores estes abaixo do que é recomendado pela legislação vigente para leites fermentados (mínimo  $10^7$  UFC/g) (BRASIL, 2007). O mesmo foi constatado no iogurte exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal, cujas contagens variaram de 4,20 a 5,16 log UFC/g (Figura 3A). Já na presença do prebiótico oligofrutose (Figura 3C), percebeu-se um aumento dessas contagens tanto no iogurte exposto como não exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal, sendo que no iogurte exposto a essas condições as contagens variaram de 4,80 a 6,50 log UFC/g, enquanto que no iogurte não exposto obteve-se uma média de 7,20 log UFC/g, valor este em conformidade com a legislação vigente para leites fermentados (mínimo  $10^7$  UFC/g). Esses dados demonstram que a oligofrutose estimulou o crescimento da cultura *starter*, aumentando a viabilidade destes micro-organismos no iogurte mesmo exposto às condições simuladas do TGI.

Autores sugerem que a seleção do probiótico e prebiótico é importante para que haja a sinergia entre eles (SAAD, 2006). Özer, Akin e Özer (2005) verificaram que a adição de inulina e lactulose num iogurte suplementado com *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* não afetou o crescimento das cepas características do iogurte, mas estimulou o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* no produto, resultado esse contrário ao observado no presente estudo, para a cultura *starter* quando se adicionou a oligofrutose como ingrediente prebiótico.

Sabe-se que a associação entre o prebiótico e o probiótico pode favorecer a sobrevivência do micro-organismo bem como aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, tanto no organismo do hospedeiro quanto no alimento. Isso se deve, provavelmente, à interação entre eles anteriormente ao consumo, podendo, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1995, PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002, SAAD, 2006).

Na literatura, vários estudos com diferentes matrizes alimentares, micro-organismos e prebióticos apontam esse sinergismo. Akin, Akin e Kirmaci (2007) verificaram que a inulina estimulou o crescimento de *L. acidophilus* e *B. lactis* em sorvete fermentado aumentando a viabilidade destes micro-organismos no produto. Capela, Hay e Shah (2006) observaram que a adição dos prebióticos frutoligossacarídeo, inulina e amido resistente em iogurte aumentou a viabilidade dos micro-organismos probióticos (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium* spp.) quando comparado ao iogurte sem prebiótico. Cardarelli et al. (2008) mostraram que o uso de inulina associada ao probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* em mousse de chocolate conferiram um potencial simbiótico ao produto bem como propriedades sensoriais favoráveis.

Comportamento similar foi observado no presente estudo em que se constataram contagens maiores do *L. acidophilus* quando esse foi adicionado ao iogurte juntamente com o prebiótico oligofrutose e não exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal (Figura 3D), variando de 6,02 a 7,12 log UFC/g. Entretanto, quando esse micro-organismo foi adicionado sem a oligofrutose e não exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal, as contagens estiveram entre 6,34 e 6,61 log UFC/g.

Quando exposto às condições simuladas do esôfago-estômago observou-se uma tendência de queda das contagens do *L. acidophilus*, tanto na ausência da oligofrutose (Iogurte probiótico - Figura 3B) como na presença deste (Iogurte simbiótico - Figura 3D), sugerindo que a presença deste prebiótico não protegeu tanto a estirpe estudada. Corroborando com esses dados, em pesquisa realizada por Bedani, Rossi e Saad (2013), os autores ao elaborarem um produto fermentado a base de soja e adicionado de *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* Bb-12, com e sem inulina, não observaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os produtos, sugerindo que o prebiótico não protegeu o probiótico contra a ação do suco gástrico. Da mesma forma, no que se refere ao iogurte controle, em estudo de Uriot et al. (2015) em que utilizaram um modelo dinâmico gastrointestinal (TIM) para explorar a sobrevivência da bactéria *Streptococcus thermophilus* no iogurte e as atividades metabólicas induzidas no intestino humano simulado, os autores também observaram uma redução da taxa

de sobrevivência das cepas deste micro-organismo ao passarem pelos compartimentos simulados do TGI. A literatura refere que matrizes alimentares sólidas, a exemplo de queijos, oferecem maior proteção à cultura probiótica no que diz respeito ao suco gástrico, quando comparadas a leites fermentados e iogurtes. Isso estaria relacionado ao fato de que queijos são produtos com características peculiares que conferem proteção às bactérias probióticas contra a ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares, durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal. Esse conjunto de características, o qual inclui, entre outros, pH próximo ao neutro, atividade de água normalmente elevada (dependendo, obviamente, da quantidade de sal do queijo e das condições de maturação, no caso de ser um produto maturado), matriz sólida (que facilita o “inserção da bactéria”) e concentração relativamente elevada de gordura, leva a proposição que esses produtos sejam mais adequados como veículos para os probióticos, ao contrário dos iogurtes (GARDINER et al., 1999; MADUREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014; ROLIM et al., 2015), o que pode justificar os dados encontrados nesta pesquisa.

Para que os benefícios à saúde produzidos por bactérias probióticas sejam obtidos, é necessária a ingestão de uma dose diária de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC/g ou mL de alimento (REID et al., 2003). Assim, considerando um consumo de produtos lácteos de 100 g, estes devem conter pelo menos  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto e dentro do seu prazo de validade (ANVISA, 2001; ANVISA, 2007; MARUYAMA et al., 2006; RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; RENHEIMER, 2000). No início da digestão simulada, quando o *L. acidophilus* foi adicionado sem a presença da oligofrutose ao iogurte observou-se contagens viáveis de 6,5 log UFC/g, estando de acordo com as recomendações de contagens de micro-organismos probióticos no momento da compra e consumo do produto. Em contrapartida, quando na presença da oligofrutose, verificou-se uma contagem levemente abaixo desta recomendação, correspondendo a 5,71 log UFC/g. Acredita-se que com o processo de fermentação deste micro-organismo, levando a degradação das moléculas de oligofrutose e concomitante produção de ácidos orgânicos, possivelmente tenha contribuído para uma ligeira queda da contagem destes, em virtude do pH adverso criado no meio.

Todavia, podemos observar na Tabela 2 que as amostras obtidas no final da digestão experimental apresentaram contagens viáveis de 4,20 log UFC/g de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* (Figura 3A - Iogurte controle); 4 log UFC/g de *L. acidophilus* na ausência de oligofrutose (Figura 3B - Iogurte probiótico); 5,37 log UFC/g de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* na presença de oligofrutose (Figura 3C - Iogurte prebiótico) e 4 log UFC/g de *L. acidophilus*

na presença de oligofrutose (Figura 3D - Iogurte simbiótico). Observa-se que as contagens finais quando os iogurtes probiótico e simbiótico alcançaram o íleo estiveram fora do que a resolução preconiza para esse tipo de produto, que deve variar de 6 a 7 log UFC/g, número mínimo recomendado de bactérias probióticas no alimento no momento do consumo, garantindo um impacto favorável sobre a saúde do consumidor.

**Tabela 2** - Amostras obtidas no final da digestão experimental.

Amostras obtidas final da digestão	<i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrüeckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i> na ausência de oligofrutose	<i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrüeckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> na presença de oligofrutose	<i>L. acidophilus</i> na presença de oligofrutose
Contagens viáveis	4,2 log UFC/g	4 log UFC/g	5,37 log UFC/g	4 log UFC/g

Embora tenham sido observadas contagens do micro-organismo probiótico na presença e na ausência de oligofrutose ao final da digestão simulada abaixo do que a legislação recomenda, em estudo de Li et al. (2014) em que avaliaram a sobrevivência de *L. casei* adsorvido em argila mineral (montmorillonite - MMT) e adicionado em iogurte frente às condições simuladas gastrointestinais durante armazenamento refrigerado, os autores verificaram que este micro-organismo não foi protegido pela argila mineral, não detectando-se sequer contagem do probiótico após exposição às condições simuladas do duodeno e íleo.

A capacidade de sobrevivência de bactérias probióticas à ação de sais biliares é um dos critérios utilizados para selecionar potenciais culturas probióticas (MORELLI, 2000). Os sais biliares são importantes na eliminação de bactérias patogênicas presentes no trato gastrintestinal, pois são capazes de solubilizar a membrana plasmática dos agentes patogênicos pela sua ação detergente. Essa ação, porém, não afeta exclusivamente as bactérias patogênicas e os micro-organismos probióticos precisam, portanto, ser tolerantes a esses sais biliares para que possam exercer efeitos benéficos aos seus consumidores (BALLUS et al., 2010), o que foi possível observar neste estudo, em que o *L. acidophilus* (tanto no iogurte probiótico como no iogurte simbiótico) muito embora tenha sido afetado pela ação dos sais de

bile presentes no duodeno, ainda conseguiu alcançar o íleo em contagens suficientes para aderir a mucosa intestinal e desempenhar sua função terapêutica.

No estudo de Bedani, Rossi e Saad (2013), o *L. acidophilus* presente no produto fermentado a base de soja também foi sensível às fases de ensaio contendo bile, uma vez que uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na população do probiótico foi observada para a maioria das amostras entre as fases gástricas e entéricas. Resultados semelhantes foram constatados também por Buriti et al. (2010), usando a mesma estirpe (*L. acidophilus* La-5) incorporados em mousses de goiabeira. A bile afeta os fosfolípidos e proteínas das membranas celulares bacterianas, perturba a homeostase celular e as bactérias Gram-positivas parecem ser mais sensíveis aos efeitos deletérios dela do que as Gram-negativas. No entanto, a tolerância para a bile é uma característica dependente da estirpe que não deve ser generalizada em termos de espécies (BEGLEY; GAHAN, HILL, 2005).

Buriti et al. (2010) também relataram que a inulina melhora a tolerância do *L. acidophilus* La-5 às condições gastrointestinais durante a primeira semana de armazenamento refrigerado do mousse de goiaba simbiótico. Todavia, no presente estudo, o efeito protetor do prebiótico oligofrutose não foi observado ao longo da travessia gastrointestinal após 7 dias de armazenamento refrigerado.

Reforça-se que ao final da digestão, muito embora a bactéria probiótica testada no iogurte, tanto na ausência como na presença da oligofrutose (Figura 3B e 3D, respectivamente), ter alcançado o intestino em quantidades abaixo do recomendado (com média de 4 log UFC/g), essas contagens são viáveis para aderir à parede intestinal, colonizar o intestino com eficácia e desta forma exercer suas atividades biológicas. Apenas estirpes que são extremamente sensíveis ao ácido *in vitro* não seriam capazes de sobreviver ao trânsito gástrico (que não foi o caso), e pelo menos uma resistência moderada ao baixo pH parece ser necessário para o micro-organismo desempenhar a sua ação probiótica, que possivelmente foi desempenhada pela cepa probiótica estudada. Além disso, ao alcançar o intestino, mesmo que em contagens baixas, esse micro-organismo deve ter a capacidade de colonizar o intestino de forma eficaz, o que exige estudos futuros para elucidar melhor esse mecanismo, especificamente desta cepa neste produto.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados constatou-se que o iogurte controle adicionado da cultura *starter* quando exposto ou não exposto às condições simuladas do trato gastrointestinal apresentaram contagens abaixo do preconizado para este tipo de produto e quando adicionados do prebiótico oligofrutose, percebeu-se um aumento dessas contagens, sugerindo que a oligofrutose estimulou o crescimento da cultura *starter* aumentando a viabilidade destes micro-organismos no iogurte, mesmo quando exposto às condições simuladas do TGI.

Todavia, no iogurte adicionado do probiótico *L. acidophilus* (LA-5) na presença ou não da oligofrutose, observou-se uma tendência de queda das contagens deste micro-organismo, sugerindo que o prebiótico não protegeu tanto a estirpe estudada. Reforça-se que ao final da digestão, muito embora a bactéria probiótica testada no iogurte, tanto na ausência como na presença da oligofrutose, ter alcançado o intestino em quantidades abaixo do recomendado, essas contagens são suficientes para aderir à parede intestinal, colonizar o intestino com eficácia e desta forma exercer suas atividades biológicas, demonstrando-se assim como um produto com potencial probiótico e veículo para carrear tanto a bactéria láctica probiótica estudada como o ingrediente prebiótico em questão.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Comissões técnico-científicas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos.** Recomendações da comissão já aprovadas pela diretoria de alimentos em toxicologia. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos:** lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em agosto, 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 19 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Alimentos.** Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Técnico-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 28 ago. 2010.

AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in ice cream. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 93-99, 2007.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, n. 1, p. 348-355, 2013.

BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do CEPPA**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BARROS, A. J. P.; LEHFELD, N. S. **Fundamentos da metodologia:** um guia para iniciação científica. 2000.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 282-289, 2013.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995, 129 p.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. p. 625-651, 2005.

BORNET, F. R. J. Undigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59 (suppl), p. 763-769, 1994.

BRASIL. Resolução Normativa da Câmara Técnica de Alimentos nº 15 de nov. 1978. Estabelece normas que têm por objetivo fixar a identidade e características mínimas de qualidade a que devem obedecer as geléias de frutas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 01 março. 1979. Seção I, pt. 1, p. 2.929-31.

BRASIL. 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 União**, Brasília, 3 mai. 1999. Seção 1, p.11. 1999a.

BRASIL. Secretaria de Agricultura. Portaria nº. 56 de 17 de dezembro de 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 1999b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento .Resolução nº 5 de 13 de novembro de 2000. Oficializar os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**. 27 de novembro de 2000. Seção I, p.9

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1. p. 5.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectantes, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food research international**, v. 39, n. 32, p. 203 – 211, 2006.

CARDARELLI, H. R.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO J.H.A., CASTRO, I.A., SAAD, S.M.I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 88, n. 8, p. 1318-1324, 2008.

CASIRAGHI, M. C.; CANZI, E.; ZANCHI, R.; DONATI, E.; VILLA, L. Effects of a synbiotic milk product on human intestinal Ecosystem. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 499-506, 2007.

CASTRO, W. F.; CRUZ, A. G.; BISINOTTO, M. S.; GUERREIRO, L. M. R.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; CUNHA, R. L.; DELIZAT, R. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 16-25, 2013.

CHOI, S. Y.; CHUNG, M. J.; LEE, S. J.; SHIN, J. H.; SUNG, N. J. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 485–491. 2007.

CHEN, C.; WALKER, W. A. Probiotics and Prebiotics: Role in clinical disease states. **Advances in Pediatrics**, v. 52, p.77-113, 2005.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5 (suppl), p. 1052–1057, 1999.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. M446–M450, 2007.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. Disponível em:<<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2012. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FERREIRA, C. L. L. F. Valor nutricional e bioterapêutico de leites fermentados. **Revista Leite & Derivados**. Ano 6, n. 36, p. 46-52, 1997.

FERREIRA, C. L. L.; TESHIMA, E. Prebióticos: Estratégia dietética para manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano III, n.16, p. 22-25, 2000.

FERREIRA, C. L. L. F.; MALTA, H. L.; CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; GUIMARÃES, A.; JACOB, F.; CUNHA, R. M.; PEREIRA, S.; OLIVEIRA, S. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 152- 158, 2001.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados (aspectos bioquímicos e tecnológicos)**. 3. ed. Caderno Didático 43-Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, 2005.

FISBERG, M.; NOGUEIRA, M.; FERREIRA, A. M. A.; FISBERG, R. M. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. **Revista de Pediatria Moderna**, v. 35, n. 7. 1999.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.

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

GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Evaluation of cheddar cheese as food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1379-1387, 1999.

GASPAR, P.; ESCRIBANO, A. J.; MESÍAS, F. J.; ESCRIBANO, M.; PULIDO, A. F. Goat systems of Villuercas-Ibores area in SW Spain: Problems and perspectives of traditional farming systems. **Small Ruminant Resear**, v. 97, n. 1-3, p. 1-11, 2011.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOLDBERG, I. **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. Editora Cahpman & Hall, New York. 1994. 571 p.

GOMES, A. A.; BRAGA, S. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; LOLLO, P. C. B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFÁN, J.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4777-4786. 2011.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 1, p. 155-163, 2004.

HOLD, K. M.; DE BOER, D.; ZUIDEMA, J.; MAES, R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. **International Journal of Drug Testing**, v. 1, n. 1, p. 1-36. 1995.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253-260. 2004.

JARDIM, W. R. **Criação de caprinos**. 239 p. 1984.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal Bioscience**, v. 27, n. 7, p. 703-714, 2002.

LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1704-1712. 2007.

LI, S.; JIANG, C.; CHEN, X.; WANG, H.; LIN, J. *Lactobacillus casei* immobilized onto montmorillonite: Survivability in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. **Food Research International**, v. 64, p. 822-830, 2014.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748. 1965.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 287-296. 2005.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GÓMEZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 768-774, 2006.

MARUYAMA, L. Y; CARDARELLI, H. R; BURITI, F. C. A; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 386 – 388, 2006.

MEDEIROS, L. P. et al. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração**. 177 p. 1994

MILES, O.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749. 1938.

MOLIS, C.; FLOURIÉ, B.; OUARNE, F.; GAILING, M.-F.; LARTIGUE, S.; GUIBERT, A.; BORNET, F.; GALMICHE, J.-P. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 3, p. 324-328, 1996.

MORAL, A. M.; MORENO-ALIAGA, M. J.; HERNÁNDEZ, A. M. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. **Nutrición Hospitalaria**, v. 18, n. 4, p. 181-188, 2003.

MORELLI, L. *In Vitro* Selection of Probiotic *Lactobacilli*: A Critical Appraisal. **Current Issues Molecular Biology**, v. 1, n. 2, p. 59-67, 2000.

NAIDU, A. S., CLEMENS, R. A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, p. 431-462. 2000.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D.C. Fructooligosacarídeos: novos ingredientes funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 27-34, 2002.

NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 583–592, 2005.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

OUWEHAND, A. C.; TUOMOLA, E. M.; TOLKKO, S.; SALMINEN, S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 119–126. 2001.

OSMARI, E. K.; CECATO, U.; MACEDO, F. A. F.; SOUZA, N. E. Nutritional quality indices of milk fat from goats on diets supplemented with different roughages. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 128-132, 2011.

ÖZER, D; AKIN, S.; ÖZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food science technology international**, v. 11, n. 1, p. 19-24, 2005.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8. 1974.

PEREDA, J. A. O. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. v. 2. 2005. 579 p.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMANCALDENTY, K. M.. MYLLÄRINEN, N. P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTNEN, K. Development of functional ingredient for gut health. **Trends Food Science Technology**, v. 13, n. 1, p. 3-11. 2002.

RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. **Yoghurt: scientific grounds, technology, manufacture and preparation**. Copenhagen: Tech. Dairy Publishing House, 1978, 427 p.

RASTALL, R. A.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 490–496, 2002.

REID, G.; SANDERS, M. E.; GASKINS, H. R.; GIBSON, G. R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. R. New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 37, n. 2, p. 105-118, 2003.

REIG, A. L. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, v. 16, n. 1, p. 63-68, 2002.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71 (suppl), p. 1682-1687, 2000.

ROLIM, F. R. L. K.; SANTOS, M. O.; BARCELOS, S. C.; EGITO, A. S.; RIBEIRO, T. S.; CONCEIÇÃO, M. L.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C. R. E. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its

inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 807-813, 2015.

ROSS, R. P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1410–1417. 2005.

RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrüeckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v. 49, n. 10, p. 471-475, 1997.

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

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 341-347, 1998.

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 3, p. 302-310, 2011.

SAS Institute. **SAS User's Guide: Statistics; Version 8.0**. SAS Institute, Cary, NC, USA. 1999.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361s-364s, 2001.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA, N. M. A.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 2, n. 37, p. 127-135, 2003.

SPILLER, G. A. **CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition**. CRC Press. 3. ed. ISBN 0849323878, 9780849323874. 709 p. 2001

TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. - Yoghurt technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**. v. 43, n. 12, p. 939-977, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R.K. Yogur: ciencia y tecnologia, **Zaragoza**. 2000. 368 p.

URIOT, O.; GALIA, W.; AWUSSI, A. A.; PERRIN, C.; DENIS, S.; CHALANCON, S.; LORSON, E.; POIRSON, C.; JUNJUA, M.; ROUX, Y. L.; ALRIC, M.; DARY, A.; BLANQUET-DIOT, S.; ROUSSEL, Y. Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. **Food Microbiology**, p. 1-12, 2015. In Press, Corrected Proof. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.007>.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

VO, T. -S.; KIM, S. -K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 16-17, 2013.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 107-117, 1996.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An Overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 473-479, may/jun. 1998.