

 *Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITES  
FERMENTADOS PROBIÓTICOS

ANDREA MARTA DE SENA LAGO

Salvador  
Bahia - Brasil  
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITES  
FERMENTADOS PROBIÓTICOS

ANDREA MARTA DE SENA LAGO

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisa Teshima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência de Alimentos.

Salvador  
Bahia - Brasil  
2009



*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Dedico

Aos meus pais, Amaro e Jane, e  
aos meus irmãos, Aneida, Adila, Ana e Alex  
pela compreensão e apoio.

## AGRADECIMENTOS

À Deus toda a glória, que me concedeu vida e saúde para vencer mais uma etapa da minha vida.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização do meu trabalho. Minha profunda gratidão e admiração, particularmente:

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Elisa Teshima, pela orientação ao longo do trabalho.

À Enrique Gutiérrez Póo, pelo apoio, paciência, compreensão, colaboração e alegria compartilhada.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Spínola pelo apoio, incentivo e colaboração imprescindíveis.

À prof<sup>a</sup> Rosemary pela atenção e colaboração nas minhas análises.

À prof<sup>a</sup> Dra Simone Oliveira pela colaboração nas correções.

À prof<sup>a</sup> Dra Ana Carolina C. Chaves pelo auxílio e apoio no meu trabalho.

À Secretária de Saúde da Prefeitura Municipal de Alagoinhas Ellis Rosa, pela concessão no trabalho.

Aos meus diretores Jeane Meyer e Cleber Cerqueira, pela compreensão, solidariedade e apoio, fundamentais na minha jornada.

Aos meus colegas de trabalho, em especial a Sandra, Jaqueline, Hugo, Glauber, Jaqueline, Gleide, Gabriela, Virgínia, Mariane, Rosana, Guaciara e Rosalvo pela paciência, solidariedade e amizade.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, em especial, ao Laboratório de Qualidade de alimentos, pelos recursos oferecidos.

Ao Laboratório de Bromatologia da UFBA, pela disponibilidade nas análises e aos funcionários pelo apoio.



*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

e Simões e Érik Dean, pela colaboração no meu trabalho.

À graduanda do curso de Engenharia de alimentos Priscila pela colaboração e treinamento.

Às minhas amigas Carla Ulm e Adriana pela amizade, companhia e acolhimento.

Aos funcionários do Laboratório de Qualidade de Alimentos, em especial, às funcionárias Patrícia e Vanessa, pela disponibilidade e auxílio.

Aos professores do Mestrado de Ciência de Alimentos, pelo enriquecimento pessoal e profissional que trouxeram para minha vida.

Aos meus colegas do curso de Pós-graduação, em especial a Leonardo, Taís, Daniel, Henrique, Cristina, Lívia e Jaff pela convivência, incentivo e alegrias compartilhadas.



*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Todos têm um propósito de vida... um dom singular ou um talento único para dar aos outros. E quando misturamos esse talento singular com benefícios aos outros, experimentamos o êxtase da exultação do nosso próprio espírito . entre todos, o supremo objetivo.+

DEEPAK CHOPRA

## Sumário

	Página
Lista de figuras.....	10
Resumo.....	11
<i>Abstract</i> .....	12
Introdução.....	13
Objetivos.....	16

### Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

1. Estudo de mercado.....	17
2. Composição dos leites fermentados.....	18
3. Importância nutricional dos leites fermentados .....	20
4. Gênero <i>Lactobacillus sp</i> .....	22
4.1 Caracterização .....	23
5. Culturas lácticas .....	24
5.1 Fatores que influenciam na viabilidade bacteriana .....	26
6. Efeitos biológicos dos probióticos .....	29
7. Efeitos terapêuticos dos probióticos .....	31
7.1 Inibição á infecções intestinais .....	32
7.2 Intolerância à lactose .....	34
7.3 Efeito no metabolismo dos lipídios .....	34
7.4 Outras situações clínicas .....	35
8. Eficácia e Segurança dos probióticos .....	35

8.2 Estudos <i>in vivo</i> em animais e em humanos .....	37
9. Rotulagem .....	40
10. Aspectos Legais . Brasil .....	41
Referência Bibliográfica .....	47

## Capítulo 2 É Avaliação físico-química e microbiológica de leites fermentados em armazenamento refrigerado.

Resumo .....	54
<i>Abstract</i> .....	55
1. Introdução .....	56
2. Material e Métodos .....	57
2.1 Amostragem.....	57
2.2 Avaliação microbiológica.....	58
2.3 Avaliação físico - química.....	59
2.4 Avaliação de rotulagem.....	59
2.5 Análise de resultados.....	59
3. Resultados e discussão.....	60
3.1 Viabilidade de <i>Lactobacillus sp</i> .....	60
3.2 Avaliação dos microrganismos contaminantes .....	62
3.3 Avaliação físico-química .....	63
3.4 Avaliação de rotulagem .....	65
4. Conclusão .....	67
Referência Bibliográfica .....	68



**PDF Complete**

*Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

.....	70
Anexos.....	71
Anexo 1.....	72
Anexo 2 .....	74
Anexo 3 .....	75
Anexo 4.....	76

## Lista de Figuras

	Página
1 Relação dos maiores mercados mundiais de bebidas probióticas referente aos anos de 2007 e 2008 .....	18
2 Características comerciais dos leites fermentados.....	58
3 Irregularidades nos rótulos dos leites fermentados.....	66
4 Resultado das determinações físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados no início do prazo de validade, BA, 2008.....	60
5 Resultado das determinações físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados no último dia de validade, BA, 2008.....	62
6 Aditivos e coadjuvantes de tecnologia/elaboração, BRASIL, 2007.....	72
7 Requisitos físico-químicos dos leites fermentados, BRASIL, 2007.....	74
8 Contagem de microrganismos específicos, BRASIL, 2007.....	75
9 Características dos produtos analisados com e sem alegação funcional.....	76

## AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS

Autora: Andrea Marta de Sena Lago

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Elisa Teshima

### Resumo

O presente estudo objetivou a avaliação de cinco diferentes marcas de leites fermentados comerciais, com e sem alegação funcional, em duas mensurações (no início e no final do prazo de validade). Foram avaliados os efeitos do armazenamento sobre os Lactobacilos, pH, acidez e a presença de contaminantes. Foram avaliados ainda, os rótulos dos produtos e comparados quanto aos parâmetros das legislações brasileiras. As determinações físico-químicas realizadas foram: gordura, proteína, acidez e pH. Em relação às análises microbiológicas foi realizada a contagem de coliformes totais e termotolerantes, lactobacilos, bolores e leveduras. Os resultados obtidos demonstraram que, durante o armazenamento, houve alterações físico-químicas e microbiológicas dos produtos. Observou-se redução de até um ciclo logarítmico na população de lactobacilos, provavelmente devido as condições de armazenamento (tempo e temperatura) e as variações de pH e acidez. Ainda assim, todas as contagens mantiveram-se dentro dos padrões estabelecidos. Os rótulos dos leites fermentados investigados ainda não se adequaram as exigências da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Palavras-chave: Leites fermentados, Lactobacilos, Rotulagem, Legislação.



## EVALUATION OF STANDARD OF IDENTITY AND QUALITY OF PROBIOTICS FERMENTED MILKS

Author: Andrea Marta de Sena Lago

Advisor: Prof<sup>a</sup> Dra Elisa Teshima

This study aimed the evaluation of five different brands of commercial fermented milk with and without claim performance in two measurements, at the beginning and end of the period of validity. We evaluated the effects of storage on the Lactobacilli, pH, acidity and the presence of contaminants. We evaluated also the labeling of the products and compared results to the parameters required by the Brazilian laws. The carried out physico-chemical determinations were: fat, protein, acidity and pH. For microbiological analysis was performed count total and thermotolerant coliform, lactobacilli and yeast. The results showed that, during storage, there were physical, chemical and microbiological changes in the products. There was a reduction of up to a logarithmic cycle in the number of lactobacilli, probably due to the storage conditions (time and temperature) and to the changes in pH and acidity. However, all the counts remained within the established standards. The labels of fermented milk are not yet compliant with the requirements of ANVISA (National Health Surveillance Agency).

Keywords: fermented milk, Lactobacilli, Labeling, Legislation.

## 1. Introdução

O conceito de que a natureza dá aos alimentos funções curativas e de promoção a saúde não é recente. Há 2.500 anos, Hipócrates proclamou: *“Seja o alimento o seu medicamento”*. Para o filósofo grego, as doenças eram ocasionadas pela natureza e os sintomas eram uma reação do organismo. O tratamento médico apenas auxiliava a natureza a curar o paciente.

No passado, havia uma relação direta entre alimentação e medicina. Os alimentos tinham a função de curar, conservar a saúde e prevenir doenças. Com o decorrer do tempo, houve uma substituição dos hábitos alimentares em função da própria mudança de vida. Os excessos eram prejudiciais e se observava uma relação dieta /saúde/ doença.

Atualmente, fatores como álcool, estresse, uso excessivo de antibióticos, aliados a uma dieta cada vez mais empobrecida, conduzem a um enfraquecimento da microbiota, podendo levar a várias manifestações de doenças como câncer de cólon, distúrbios gastrointestinais, doenças cardíacas e outros. Nesse contexto, conseqüente ao bem-estar e a saúde, o interesse cresceu tornando-se um alvo para as pesquisas e o futuro desenvolvimento da indústria de alimentos funcionais.

A portaria nº 398 da ANVISA/MS (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define alimento funcional como todo alimento que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999 a).

Dentre as inúmeras substâncias bioativas que compõe os alimentos funcionais, os probióticos, prebióticos e simbióticos ganham importância pelas suas propriedades reconhecidas e pela capacidade de serem vinculados aos

alimentos de consumo habitual da população. Os prebióticos são fibras não digeríveis.

Os leites fermentados são os principais carreadores das bactérias probióticas. São definidos como produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou por reconstituição, adicionado ou não de outros produtos lácteos e por fermentação láctea mediante ação de cultivos de microrganismos específicos.

As bactérias probióticas adicionadas nos leites fermentados devem ser viáveis, ativas e abundantes durante o prazo de validade especificado pelo fabricante. De acordo com a cultura láctica empregada e o tipo de processamento, os leites fermentados podem apresentar diferentes características no produto final. Eles podem ser classificados em: iogurtes, leites fermentados ou cultivado, Kefir e Kumys, (BRASIL, 2007).

O leite fermentado só pode receber a denominação de **Probióticos+** se possuir culturas probióticas com propriedade funcional reconhecida, uma vez que os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os gêneros mais utilizados nos leites fermentados são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Estas bactérias têm que ser biologicamente seguras, de origem humana, ter a capacidade de se manter viáveis durante o processamento e armazenamento do produto, resistir à acidez gástrica e a bile, possuir propriedades de colonização, produzir compostos antimicrobianos e serem ativas no intestino.

Vários fatores podem interferir na viabilidade das bactérias probióticas incorporadas nos produtos lácteos e os efeitos profiláticos e terapêuticos

microrganismos só poderão ser observados se elas estiverem viáveis em quantidades adequadas no momento do consumo.

No entanto, para a garantia da viabilidade das bactérias probióticas em produtos lácteos, ainda não existem metodologias oficiais de contagem, nem um consenso da quantidade mínima necessária para que as bactérias probióticas exerçam determinado benefício à saúde. Em geral, a indicação da quantidade mínima varia de  $10^6$  a  $10^8$  UFC (Unidade Formadora de Colônia) por grama do produto.

Os alimentos probióticos com alegação funcional são controlados pela ANVISA, por meio de uma comissão específica, que estabelece diretrizes para o registro de novos produtos no mercado, bem como avalia e aprova a alegação, a depender da análise, da comprovação científica apresentada pela empresa. A indústria e o comércio seguem essas normas definidas na legislação para garantia dos padrões de identidade e qualidade.

Essa pesquisa teve como objetivo avaliar cinco marcas de leites fermentados, quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e rotulagem, para em seguida, serem comparados aos padrões do Regulamento técnico de leites fermentados do MAPA, (Brasil, 2007) e com as legislações específicas da ANVISA.

O presente estudo oferece informações dos leites fermentados comerciais e o efeito das condições de armazenamento na viabilidade de bactérias lácticas, pH, acidez, contaminantes, em dois momentos de análise: no início do prazo de validade (primeira mensuração) e no final do prazo de validade (segunda mensuração). Considerando que os fatores intrínsecos interferem na viabilidade dos microrganismos e nas características finais do produto e que estas requerem condições adequadas para o seu armazenamento, justifica-se o presente trabalho.

## Objetivos

### Objetivo Geral

Avaliar os leites fermentados comerciais durante a vida de prateleira e verificar o atendimento dos resultados alcançados aos parâmetros do padrão de identidade e qualidade de leites fermentados estabelecidos na Instrução Normativa de nº 46 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2007a).

### Objetivos específicos

- Caracterização físico-química
  - ✓ Determinação do teor de acidez titulável
  - ✓ Determinação de gordura
  - ✓ Determinação de proteína
- Avaliação microbiológica
  - ✓ Contagem de Bactérias lácticas totais
  - ✓ Contagem de Coliformes (35°C).
  - ✓ Contagem de Coliformes (45°C).
  - ✓ Contagem de Bolores e leveduras
- Avaliação de Rotulagem

## Capítulo 1 . Revisão de Literatura

### 1 Estudo de mercado

Com a procura cada vez maior dos consumidores por alimentos que contribuam para a sua saúde e qualidade de vida, empresas do setor respondem com a busca de conhecimentos específicos para a área, com lançamentos de novos produtos e processos, que resultam na disponibilidade cada vez maior de alimentos que atendam a esses requisitos no mercado. Dessa forma, a área de alimentos funcionais tem crescido bastante em todo o mundo.

De acordo com o sítio eletrônico de uma agência de pesquisa de mercado na área de alimentos apresentado por Nielsen (2009), as bebidas probióticas registraram um sólido crescimento entre os anos de 2006 e 2007, na medida em que novos produtos são lançados em todo mundo, como observado na Figura 1. De acordo com a agência, os mercados europeus são particularmente fortes para esta categoria, apesar do maior crescimento percentual, atualmente, ser observado na Argentina. O Brasil acompanhou essa nova tendência mundial e está entre os 10 maiores mercados mundiais de bebidas probióticas.

Os alimentos funcionais e as bebidas energéticas constituíram a maior porção do mercado brasileiro de alimentos destinados à saúde e bem-estar com crescimento de 8% no ano de 2007 e vendas em torno de U\$ 4 bilhões, segundo à NUTRA, 2009. As empresas Dairy Partners Americas Brasil e a DANONE lideraram as vendas com 31 % dos alimentos e 11% dos funcionais. O iogurte probiótico ACTIVIA® teve forte desempenho e foi responsável pela condução da categoria de laticínios.

Os alimentos probióticos foram aceitos pela população brasileira. Os consumidores são conscientes que esses alimentos podem ser úteis na prevenção de doenças como obesidade, hipertensão arterial, doenças cardíacas e também auxiliam no sistema digestivo, junto a uma alimentação saudável e a prática de exercícios físicos.

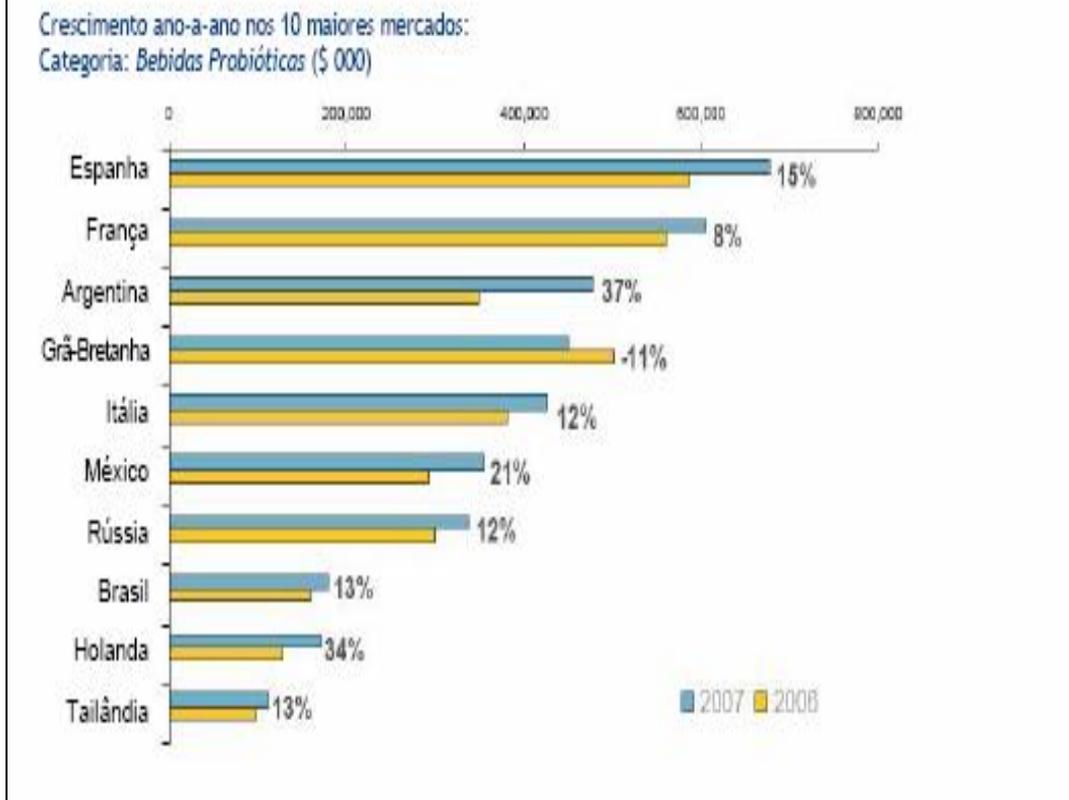


Figura 1 . Relação dos maiores mercados mundiais de bebidas probióticas referente aos anos de 2006 e 2007.

## 2. Composição dos leites fermentados

Os leites fermentados devem ter como componente obrigatório o leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura e cultivos de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 2007).

Com relação aos componentes opcionais, os leites fermentados podem conter:

a) leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou butteroil, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros e concentrados lácteos.

pedaços, polpa(s), suco(s) e outros preparados à base de frutas e maltodextrinas.

c) Outras substâncias alimentícias tais como: mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café, outras, separadas ou combinadas.

d) Açúcares e/ou glicídios (exceto polialcoóis e polissacarídeos).

e) Cultivos de bactérias lácticas.

f) Amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de até 1% (m/m) do produto final.

g) Ingredientes opcionais não lácteos, separados ou combinados deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final.

Em relação aos aditivos alimentares, que são substâncias adicionadas aos alimentos com o propósito de manter ou modificar o sabor e/ou melhorar a sua aparência, os mesmos devem ter sido objeto de aprovação prévia e deve constar no *Codex Alimentarius*. Todos os aditivos eventualmente utilizados e não incluídos nessa lista são ilegais e o seu uso, portanto é proibido. Os aditivos devem constar na lista de ingredientes nos rótulo dos produtos (anexo1) (BRASIL, 2007).

Dentre os aditivos, ficam excetuados da autorização do uso de acidulantes, os leites fermentados adicionados exclusivamente de glicídios (com açúcar, adoçados ou açucarados). É permitido polpa de fruta ou preparado de fruta a presença de ácido ascórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio em uma concentração máxima de 300 miligramas por quilograma no produto final (BRASIL, 2007).

Durante o período de validade a população de bactérias lácticas totais deve ser de no mínimo  $10^6$  UFC/g e quanto aos critérios microbiológicos, o produto deverá cumprir os seguintes requisitos: coliformes a  $35^\circ$  :máximo de 100 NMP/g,

10 NMP/g e bolores e leveduras : máximo de 200 UFC/g, conforme Instrução Normativa nº 46 do MAPA (Brasil, 2007) (anexo 3).

Em termos de composição química, os leites fermentados são classificados em quatro tipos com base no seu conteúdo de gordura, isto é, com creme, integral, parcialmente desnatado e desnatado. Devem conter no mínimo 2,9 gramas de proteínas lácteas por 100 gramas do produto (anexo 2 ).

Além de serem elaborados com leite contendo alto teor de sólidos, cultura láctica e açúcar, os leites fermentados podem ainda ser enriquecidos com leite em pó, proteínas, vitaminas, minerais e podem ser produzidos com baixo teor ou isento de gordura (desnatado).

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiênicas. O leite utilizado deve ser isento da ação de bactérias psicotróficas para não interferir na ação das bactérias lácticas durante a fermentação, prejudicando o produto final. Essa qualidade higiênica é influenciada pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais, equipamentos da ordenha, presença de microrganismos e resíduos de drogas (BRITO e BRITO, 2001).

Após a análise qualitativa do leite, os processos de produção dos diferentes tipos de leites fermentados seguem fases de produção similares, como padronização do conteúdo de gordura, aumento dos sólidos não gordurosos do leite, homogeneização, desaeração e tratamento térmico. Quando se utilizam culturas probióticas torna-se necessário determinar ainda o tipo de cultura *starter* mais adequada, a temperatura, o tempo de incubação e a quantidade de inóculo (TAMIME, 2006).

### 3. Importância nutricional dos leites fermentados

Os leites fermentados contêm um alto teor de nutrientes que variam com o tipo de microrganismo adicionado e o processo de fabricação escolhido (GOMES e MALCATA, 2002). Considerando os perfis nutricionais desses produtos, eles se

ctea, a partir dos quais são feitos, principalmente compostos de leite desnatado (BRITO e BRITO, 2001).

A qualidade nutricional é determinada pelo seu alto conteúdo em proteínas (caseína, albumina e globulinas), lactose, vitaminas hidrossolúveis (C e B), vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), minerais (cálcio, fósforo e magnésio), gordura, fosfolipídios, esteróides, lecitinas, carotenóides, cefalina e esfingomielina (TAMIME, 1991).

Alguns componentes do leite podem ser modificados pela ação microbiana durante o processo de fermentação que podem afetar o valor nutricional e fisiológico do leite fermentado (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

A proteína, a gordura e a lactose do leite sofrem hidrólise parcial, tornando o produto facilmente digerível, sendo considerado agente regulador das funções digestivas. A acidez estimula as enzimas digestivas através das glândulas salivares.

Os carboidratos disponíveis englobam todos os compostos hidrocarbonados que podem ser assimilados pelo organismo humano e que, portanto, podem representar uma fonte de energia para seu metabolismo. A lactose do leite é um dos carboidratos mais utilizados pelos microrganismos da cultura *starter* dos leites fermentados que produzem o ácido láctico como principal produto do seu metabolismo (TAMIME, 1991).

As proteínas desempenham importante função na liberação de aminoácidos, essencial para o crescimento das bactérias lácticas e no desenvolvimento de compostos que atuam como precursores nas reações que conduzem a formação de compostos responsáveis pelo *flavor* do produto.

YADAV et.al., 2007, relatam que a adição de bactérias ácido lácticas nos produtos pode contribuir na produção de ácidos graxos livres e ácido linoléico pela lipólise da gordura do leite que vai trazer efeito hipolipidêmico no hospedeiro. Níveis elevados na absorção de cálcio e ferro e de vitaminas do

noácidos como a metionina, lisina e triptófano, são observados após o consumo de leites fermentados (TAMIME, 2001).

Entretanto, todos os valores nutricionais dos leites fermentados poderão ser afetados por fatores como a temperatura de armazenamento, tempo de exposição ao calor, exposição à luz e condições de armazenamento (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

#### 4. Gênero *Lactobacillus* sp

O gênero *lactobacillus* sp é o mais utilizado em alimentos probióticos. É um grupo bacteriano heterogêneo, contendo cerca de 149 espécies e 20 subespécie, cuja classificação está sendo constantemente modificada e novas espécies tem sido propostas (LEE, 2009). Eles são encontrados em substancias ricas em hidratos de carbono, mucosas do seres humanos e animais (cavidade oral, intestino e vagina), plantas e fezes (BERMARDEU et. al., 2007).

Os lactobacilos foram isolados por Moro em 1900, a partir das fezes de lactentes, e denominado de *Lactobacillus acidophilus* designação genérica dos lactobacilos intestinais (BISCAIA et. al., 2004).

Foi o primeiro gênero a ser empregado em bactoterapia e bactoprofilaxia, iniciado no começo do século XX, com os trabalhos de *Metchinikoff* (1907), que defendeu a importância do gênero na manutenção de uma microbiota intestinal equilibrada, inibindo a ação de microrganismos indesejáveis, Ferreira (2003) como a *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*, através da produção de substâncias bactericidas como o peróxido de hidrogênio (PIMENTEL et.al., 2005).

É um dos gêneros originais de bactérias láticas e possuem várias espécies de importância, muitas delas reconhecidas como probióticas, incluindo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. Nos alimentos podem ser utilizadas como coadjuvantes de fabricação de inúmeros produtos fermentados, como o *L. delbrueckii subs. bulgaricus* que é utilizado como cultura *starter* na fabricação de iogurtes e leites fermentados.

o seguros, entretanto, a avaliação da segurança é necessária, principalmente devido ao uso generalizado da terapia imunossupressora e antibióticos. Infecções causadas por lactobacilos probióticos são extremamente raras, mas é importante fazer uma avaliação de segurança observando propriedades relacionadas com infecções sistêmicas (VERTERLEND et.al., 2007).

O *Lactobacillus casei* subsp. *shirota* tem uma longa história de utilização segura; ele tem sido utilizado na produção de leites fermentados há muitos anos, e é um dos probióticos mais estudados na atualidade. Dentre os benefícios a saúde, podemos citar o balanço da microbiota intestinal, produção de ácidos graxos, ação anticancerígena, ativação no sistema imune e atividade antibacteriana (FUJIMOTO, 2008).

O leite fermentado da marca *Yakult* foi desenvolvido no Japão. Ele é fermentado pelo *Lactobacillus casei* subs. *shirota*, o qual foi isolado de fezes humanas. Ele é comercializado atualmente em 23 países (TAMIME, 2007).

#### 4.1 Caracterização

Os *Lactobacillus* sp têm sido classificados, com base nas suas características fenotípicas, incluindo morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração de ácido láctico e fermentação de vários carboidratos (KAO et.al., 2006).

Conforme mencionado na nona edição do Manual de Bacteriologia de *Bergey*, 1994, a diferenciação das espécies do gênero *Lactobacillus* sp exige conhecimentos especiais. Ela pode ser ambígua se baseado apenas em critérios fisiológicos ou bioquímicos (BERMARDEU et.al., 2007).

Abordagem moleculares através de métodos de reação em cadeia polimerase (PCR) são essenciais para identificação do gênero, e uma combinação de testes fenotípicos e genotípicos é necessária para determinar a espécie (CASTELLE et. al., 2006; MARAGKOUidakis et. al., 2005; HARUN-UR-RASHID, 2006).

utilizaram além da técnica de PCR, as técnicas de metodologia seletiva em placas com meio seletivo de antibióticos e eletroforese em gel para distinguir culturas mistas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *Bifidobacterium lactis* em leites fermentados.

A morfologia dos lactobacilos é de bastonetes, imóveis (com raras exceções), usualmente regulares de tamanho variado. Algumas espécies formam cocobacilos, outras, bastonetes regulares, ou longo espirais. Algumas espécies apresentam atividade de catalase ou pseudocatalase em meios contendo sangue. Podem ser homofermentativos, produzindo mais de 85% de ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e/ou ácido acético. Requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, derivados de ácido nucléicos, vitaminas, sais e carboidratos fermentáveis para o crescimento. A maioria cresce melhor em condições anaeróbicas ou microaerofílicas. A temperatura ótima de crescimento é de 30-45\_C. São acidúricos, crescendo em pH 4,5 (SILVA et. al., 2007).

O gênero *Lactobacillus sp* é composto por espécies homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias. Enquanto as bactérias homofermentativas degradam à glicose através da via Embden-Meyerhof-Parnas (glicolítica), as heterofermentativas degradam a glicose através da via oxidativa das pentoses fosfato ou hexose monofosfato (TAMIME, 2006).

## 5. Culturas lácticas

Os leites fermentados devem sua produção e características às atividades fermentativas dos microrganismos. As culturas *starter* lácteas sempre incluem bactérias que convertem lactose em ácido láctico. Elas podem ser formadas por uma ou várias linhagens.

s probióticas puras com a finalidade de se obter produtos lácteos fermentados é possível, dependendo da cepa, do nível de inoculação e da adição de determinados ingredientes, que irão favorecer a multiplicação das bactérias probióticas. Como exemplo, podemos citar a existência de produtos lácteos fermentados, nos quais são usados isoladamente o *L. acidophilus* ou *L. casei*. O que se observa nessas situações é um tempo de fermentação superior a 12 horas para atingir um pH 4,5.

A prática atual para a fabricação de leites fermentados contendo probióticos é de adicionar inicialmente bactérias convencionais do iogurte chamadas de bioajustadoras, como *L. delbrueckii subs. bulgaricus* e *S. thermophilus*, para desencadear o processo fermentativo (FERREIRA, 2003).

Esses bioajustadores têm a finalidade de melhorar o sabor, aroma e textura, aumentando a taxa de crescimento, diminuindo o tempo de fermentação, além de garantir o processo fermentativo, evitando problemas de contaminação.

Entretanto, algumas cepas de *L. delbrueckii subs. bulgaricus* promovem pós-acidificação, que reconhecidamente afeta a viabilidade das bactérias probióticas. Tal fato merece atenção especial e talvez represente o maior comprometimento da estabilidade e viabilidade das bactérias probióticas, o que reforça a necessidade de seleção de culturas bem ajustadas e previamente testadas (DONKOR et.al., 2005).

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004), analisaram três leites fermentados, um por *Streptococcus thermophilus*, outro por *Bifidobacterium* sp e o terceiro por *Lactobacillus acidophilus* e um leite fermentado elaborado pela mistura dos três leites fermentados adicionados separadamente ao longo de 21 dias de estocagem. Os autores observaram que não houve diferença significativa para os atributos sensoriais para o leite fermentado elaborado pela mistura e o que continha apenas cultura do *Streptococcus thermophilus*. A população de *Lactobacillus acidophilus* apresentou redução de um ciclo logarítmico, enquanto as outras populações mantiveram-se constantes em até 21 dias de estocagem a 8\_C.

termofílicas possuem uma temperatura ótima de crescimento entre 37\_C e 45\_C, (ROBINSON, 2002). Ostlie et.al. (2005), demonstraram o efeito da temperatura no crescimento e metabolismo de bactérias probióticas na fermentação do leite. A sobrevivência e a viabilidade celular foram dependentes da cepa e condições de incubação, entretanto a sobrevivência dos *L. acidophilus*, *L. johnsonni* e *L. rhamnosus* foi superior a do *L. reuteri* nas mesmas condições de incubação.

Na fase inicial, do desenvolvimento de um leite fermentado, as culturas probióticas são selecionadas com base não apenas em critérios funcionais, mas também em critérios tecnológicos, incluindo cultivo, rendimento industrial, melhor sobrevivência da cultura, concentração e liofilização (Vasiljevic e Shah, 2008), boa propriedade sensorial, ou seja, não deve afetar o sabor, textura e viabilidade durante o processamento (DERAZ et.al., 2007). Desta forma, elas poderão ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e funcionabilidade (OLIVEIRA et.al., 2002).

## 5.2 Fatores que influenciam na viabilidade bacteriana durante o armazenamento.

Perdas da viabilidade de bactérias lácticas no produto podem acontecer em consequência desses probióticos serem extremamente sensíveis às condições ambientais, que incluem: acidez, temperatura, valor de pH, concentrações de substratos, interações entre as espécies, presença de oxigênio dissolvido, prática de inoculação, condições de estocagem e presença de substâncias inibitórias no meio. (OLIVEIRA e DAMIN, 2003).

Uma característica fisiológica diferenciadora das bactérias lácticas é sua alta tolerância à acidez. A diminuição do pH em um produto pode ser devido a vários fatores incluindo: pH inicial, tempo de fermentação, variação de temperatura e níveis de ácidos orgânicos produzidos no final da fermentação e durante o armazenamento (DONKOR et.al., 2006). Um pH adverso afeta pelo menos dois aspectos de uma célula bacteriana viva: o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes para o interior da célula.

ambiente interagem com o pH. Em relação à temperatura, o pH do meio se torna mais ácido a medida que a temperatura aumenta. Nesses casos, o monitoramento do pH no meio, segundo Barreto et. al (2003), é essencial para assegurar a viabilidade bacteriana.

Thamer e Penna (2005) observaram a interferência do pH na viabilidade da microbiota probiótica na análise do leite fermentado. Com a diminuição do pH ocorreu uma redução nas contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp durante o armazenamento refrigerado.

Na tentativa de melhorar a viabilidade das estirpes probióticas, pode-se utilizar o encapsulamento da estirpe sensível ao ácido com alginato de cálcio, Tamime (2007). Krasaekoopt (2004) observou no seu experimento, que a sobrevivência das bactérias encapsuladas foi maior do que as bactérias livres.

Além da interferência da acidez na viabilidade probiótica, as bactérias lácticas exigem complexos fatores de crescimento como: vitaminas do complexo B, aminoácidos e bases purínicas e pirimidínicas. A riboflavina é uma vitamina necessária ao bom desenvolvimento da fermentação láctica (LIN et.al., 2005).

A incorporação de micronutrientes muitas vezes pode ser necessário para reduzir o tempo de fermentação e propiciar viabilidade das bactérias probióticas. Oliveira e Damin (2003) analisaram o efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação e viabilidade das bactérias de iogurte e probióticas em leites fermentados. A adição de sacarose e a padronização do leite diminuiu o tempo de fermentação para atingir pH 4,5 dos leites fermentados.

Gueimonde et al. (2004) analisaram sete leites fermentados comerciais com *Lactobacillus* sp e *S. thermophilus*, e observaram que as cultura de *S. thermophilus* apresentaram contagens entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC/ mL durante o armazenamento refrigerado, entretanto os lactobacilos diminuiram entre 0,75 e 1,85 log. Durante 30 dias de armazenamento refrigerado, a população desses microrganismos permaneceram acima de  $10^5$  UFC/mL.

A temperatura de armazenamento é um dos parâmetros extrínsecos que afetam a viabilidade das bactérias probióticas, já que as mesmas são

se aumenta a temperatura de conservação, mais diminui-se a viabilidade. Os leites fermentados devem ser armazenados e comercializados em uma temperatura inferior a 10°C segundo o RIISPOA, (BRASIL, 1997), para assegurar a viabilidade das bactérias no prazo de validade determinado pelo fabricante.

Uma oscilação na temperatura, durante o período de armazenamento pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos, que crescem sob temperatura de refrigeração, alterando as características dos leites fermentados.

O acúmulo de ácidos orgânicos como resultado do crescimento e fermentação também leva a perda da viabilidade de bactérias no armazenamento refrigerado. Donkor et. al. (2005) observaram uma baixa contagem de *Bifidobacterium lactis* após aumento dos níveis de ácidos orgânicos e diminuição do pH no armazenamento refrigerado.

Observou-se que a presença de organismos probióticos no leite fermentado analisado aumentou a atividade proteolítica, aumentando assim, a sobrevivência do *L. delbrueckii subs. Bulgaricus*. Por outro lado, o aumento de ácido láctico produzido por esse microrganismo afetou a sobrevivência de *B. lactis* e *L. paracasei*. Peptídeos e aminoácidos liberados promoveram o crescimento de *L. acidophilus* e sustentou a sobrevivência de *B. lactis* e *L. paracasei* (YADAV, 2007).

Outros fatores podem causar ainda uma inibição e/ou redução da atividade da cultura *starter*, ocasionando uma baixa qualidade nos produtos lácticos fermentados. Como por exemplo, a presença de componente antimicrobiano naturalmente presente no leite, resíduo de antibióticos proveniente do tratamento de mastite em vacas leiteiras, presença de bacteriófagos, presença de desinfetantes e detergentes utilizados para a limpeza de superfícies, equipamentos, bacteriocinas e diversos outros inibidores (células somáticas, sazonalidade do leite, poluição ambiental, condições de processamento, aditivos) (ROBINSON, 2002).

2) em seu experimento, observou que aditivos /flavorizantes utilizados na indústria de laticínios exerceram um efeito bacteriostático sobre os *Lactobacillus acidophilus* e que a nisina (1ppm) inibiu o crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* no processamento de leites fermentados.

## 6. Efeitos biológicos dos probióticos

O Trato Gastrointestinal (TGI) humano é um dos mais complexos ecossistemas conhecido em ecologia microbiana, geralmente contendo  $10^{10}$ - $10^{11}$  bactérias / g de conteúdo luminal. Reúne os órgãos metabolicamente mais ativos do corpo humano. A atividade das bactérias comensais no ecossistema inclui proteção contra agentes patogênicos e desenvolvimento do sistema imunológico. Os efeitos positivos sobre a saúde vêm através da nutrição cecocólica do hospedeiro (UYENO, 2007).

O epitélio intestinal desempenha um papel de fronteira e barreira imunológica, estabelecendo a interface entre o conteúdo luminal e a células imunológicas subepiteliais. Qualquer perturbação a esta barreira, desencadeada por antígenos dietéticos, microrganismos patogênicos, agentes químicos ou radiações, conduz a um aumento da permeabilidade intestinal e alterações estruturais do epitélio, as quais podem ocasionar diversos tipos de inflamação. (GOMES e MALCATA, 2001).

A correção das propriedades da microbiota autóctone desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos. O apelo dos alimentos probióticos baseia-se na premissa de que a microbiota intestinal pode ser influenciada pela dieta. Tanto a introdução de bactérias benéficas no intestino ou pela existência dessas bactérias já residentes permite a modulação do trato gastrointestinal para uma comunidade mais desejada no intestino (TAMIME, 2005).

A partir da capacidade de aderir às vilosidades intestinais, alguns microrganismos probióticos competem pelo substrato e inibem a fixação de patógenos, evitando que enterotoxinas se liguem as células do epitélio intestinal

Além disso, a adesão amplia o período de interação entre as bactérias probióticas, a microbiota intestinal e o sistema imunológico do trato intestinal. Logo, uma boa capacidade de adesão as células epiteliais do cólon ou a camada mucosa que fica sob ele é um importante critério de seleção das bactérias probióticas.

Uma vez fixada no intestino, às bactérias probióticas competem com as bactérias patogênicas na absorção de nutrientes disponíveis na luz intestinal, que é um fator limitante na manutenção das mesmas no intestino (VARAVALLO et.al., 2008).

Além da ocupação de sítios de ligação na mucosa intestinal, a produção de substâncias antibacterianas eficazes também faz parte dos mecanismos usados pelas bactérias probióticas para constituírem-se como população dominante no intestino e modificar o balanço ecológico da microbiota intestinal. Dentre essas substâncias estão o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), as bacteriocinas, ácido lático e acético (TAMIME, 2007).

As bacteriocinas são proteínas ribossomicamente sintetizadas, produzidas na fase logarítmica (*log*) do crescimento bacteriano que, diferentemente dos antibióticos, inibem somente uma pequena quantidade de cepas bacterianas intimamente relacionadas, sem prejudicar a microbiota intestinal como um todo, pois estas são digeridas por enzimas como tripsina e pepsina do trato gastrointestinal (ROSA e FRANCO, 2001; ROBINSON 2002; TAMIME 2006).

Por meio de sua atividade antibacteriana, as bactérias probióticas afetam pouco, a microbiota intestinal estabelecida, mas inibem a colonização das recém-chegadas, as quais também podem ter cepas bacterianas prejudiciais e patogênicas (Bemardeu et.al., 2007, Deraz et al., 2007), como *E. coli*, *Salmonella* ssp, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* ssp e certas espécies de bolores e leveduras (PIMENTEL, 2005; BENDALI et.al, 2008).

Para os probióticos exercerem seu efeito máximo, são necessárias a colonização e a multiplicação no intestino do hospedeiro para aumentar o número

os benéficos tais como ácidos voláteis, vitaminas e bacteriocinas, citadas anteriormente (FUJIMOTO et.al., 2008).

No entanto, a percepção que é necessária a colonização intestinal é contestada por Tamime (2006). Segundo o autor, o tempo de passagem do trato gastrointestinal é tal que permite a multiplicação de bactérias, independente da perda no material fecal. Considerando a natureza dos microrganismos autóctones que exerce seus efeitos no habitat luminal, isto indica que a colonização não é uma condição prévia para a atividade probiótica.

Vários aspectos precisam ser esclarecidos quanto ao mecanismo de ação dos probióticos. Acredita-se que eles podem ainda estimular a imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos, e o aumento da atividade dos macrófagos.

Pimentel et.al (2005) acreditam que os *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* e *L. casei* aumentam a atividade fagocitária, a síntese de imunoglobulinas (IgA) e a ativação dos linfócitos T e B. Para os autores, os probióticos estimulariam a resposta humoral e conseqüentemente promoveriam a função do intestino como barreira imunológica.

## 7. Efeitos Terapêuticos dos probióticos

Uma série de benefícios tem sido atribuída aos produtos que contém organismos probióticos. Enquanto alguns desses benefícios já foram bem definidos e documentados, outros têm demonstrado um potencial promissor em experimentos com animais e humanos (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Segundo os autores citados anteriormente, benefícios de saúde são transmitidos por estirpes de bactérias probióticas muito específicas, e, portanto, não existe estirpe universal que proporcionaria todos os benefícios propostos, mesmo sendo em estirpes da mesma espécie. Além disso, nem todas as estirpes da mesma espécie são eficazes contra definidas condições de saúde.

possuem propriedades probióticas documentadas.

Dentre elas, *Bifidobacterium animalis* (BB 12), *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* HN019, *Bifidobacterium breve* (estirpe YAKULT), *Bifidobacterium longum* BB536, *Bifidobacterium longum* BB-46, *Lactobacillus acidophilus* (LA -5), *Lactobacillus acidophilus* NCDO 1748, *L. acidophilus* CRL730, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (L.casei-01), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, (L.CASEI-CRL-431), *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *L. casei* SHIROTA, *L.gasseri* OLL2716, *L. rhamnosus* GG, LGG, *L. rhamnosus* GR-1, *L. rhamnosus* RC-14, *L. rhamnosus* HN001 (LEE e SALMINEN, 2009; HANSEN, 2008).

As propriedades documentadas de algumas cepas estão relacionadas abaixo:

- *Lactobacillus acidophilus* (LA-5): Imunologia, diarreia, constipação e saúde intestinal, tolerância a lactose, câncer, efeitos colaterais da antibioticoterapia, colesterol, infecções micóticas, desordens da pele.
- *Lactobacillus acidophilus* NCFM: efeito barreira contra patógenos, adesão aos enterócitos e muco intestinal, propriedade antimicrobiana.
- *Lactobacillus acidophilus*, (*L.acidophilus* - CRL730): imunologia, diarreia, constipação e saúde intestinal, tolerância a lactose, câncer.
- *Lactobacillus casei* subsp. *Shirota* . propriedade de adesão, constipação e equilíbrio intestinal, imunomodulação, câncer, prevenção contra doenças infecciosas inclusive contra *Helicobacter pylori*.
- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, (L.casei-01): imunologia, câncer e saúde intestinal.
- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, (L.CASEI-CRL-431): Constipação e saúde intestinal, tolerância à lactose, câncer.
- *Lactobacillus rhamnosus* GG . diarreia aguda, constipação e saúde intestinal, efeitos colaterais da antibioticoterapia, efeito barreira, imunomodulação, colite ulcerativa, dermatite atópica.

## 7.1 Inibição de infecções intestinais

rapêuticos atribuídos as bactérias probióticas reconhecido pela comunidade científica é o efeito benéfico sobre distúrbios e infecções intestinais.

Estudos clínicos têm demonstrado efeitos terapêuticos benéficos dos probióticos para prevenção e tratamento da Doença de *Crohn*, colite ulcerosa, diarréia causada por antibióticos, diarréia induzida por radiação, diarréia dos viajantes e outras. Os probióticos parecem mais eficazes para doença leve e moderada do que para doença grave (MATTIASSON, 2007; OOZER et.al., 2006).

A diarréia é a manifestação clínica mais comum de moléstia intestinal. Ela é definida como a passagem de fezes que contém quantidade excessiva de água, resultando no aumento anormal na quantidade de líquidos e peso da evacuação. Ela ocorre secundária ao desequilíbrio dos fluxos de soluto através da mucosa associado com digestão, absorção, secreção, permeabilidade ou motilidades anormais. A patogênese da diarréia envolve a absorção diminuída do fluido, hipersecreção de íons e permeabilidade aumentada.

Independente das condições que causam a diarréia (dieta, parasitas, moléstias infecciosas, intoxicações, distúrbios sistêmicos extra intestinal, antibióticos), as bactérias enteropatogênicas são oportunistas e produzem molestia intestinal por invasão e lesão do epitélio (bactérias invasivas) ou por permanecerem presas ao epitélio sem penetrá-lo, onde elas liberam enterotoxinas diarreicogênicas. As bactérias capazes de invadir a mucosa incluem *Salmonella ssp*, *Campylobacter ssp*, *Yersinia ssp*, *Shigella ssp*, *Bacillus ssp*, *Mycobacterium ssp* e outras ( REID, 2006; LIN et.al., 2006).

A terapia alimentar sintomática com probióticos está associado à produção de substâncias antimicrobianas que irão inibir o crescimento de bactérias patogênicas, através da competição pelo sitio de ligação e por nutrientes disponíveis na luz intestinal. Vale à pena salientar, que essas bactérias precisam estar viáveis no alimento no momento do consumo e a quantidade consumida adequada para tal afecção. No entanto, a dose mínima de probióticos necessários para obter um efeito clínico ainda não foi estabelecida. Parece

lem variar em função da cepa e do efeito desejado de saúde (TABASCO et. al., 2007; VERTERLUND et. al., 2007).

## 7.2 Intolerância a lactose

A lactose é o carboidrato do leite que é quebrado nos monossacarídeos galactose e glicose pela enzima *β*-galactosidase, que fica localizada no intestino delgado. Essa enzima está ausente na população adulta (exceto europeus setentrionais e centrais e descendentes) ou consequência de uma doença intestinal.

Quando não há atividade da *β*-galactosidase, a lactose atinge o cólon sem ser digerida após o consumo de leite e pode ser utilizada por microrganismos que degradam a lactose (dentre eles, bactérias potencialmente prejudiciais, tais como cepas de *E. coli*). Quando a lactose é fermentada no cólon por esses microrganismos causa flatulência, gases, náusea, dor abdominal e diarreia (TAMIME, 2006).

Segundo o mesmo autor, diversas bactérias lácticas presentes em produtos lácteos fermentados possuem uma *β*-galactosidase microbiana que sobrevive na passagem pelo estômago após o consumo, quebram a lactose no intestino delgado e a torna digerível para indivíduos intolerantes à lactose.

## 7.3 Efeito no metabolismo dos lipídios

O metabolismo dos lipídios é complexo, dependendo em parte da função hepática normal. Colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídios e triglicéridas compreendem os principais lipídios plasmáticos insolúveis na água e são transportadas na circulação com complexos protéicos. As concentrações séricas de colesterol são ajustadas por mecanismos de retroalimentação de acordo com o equilíbrio entre a ingestão, síntese, degradação e excreção. A excreção do colesterol ocorre pela via do canal alimentar, nas fezes, na forma de colesterol biliar e alimentar, sais biliares e metabólito do colesterol não absorvido (MINELLI et.al, 2004).

olesterol ocorre por difusão passiva no interior dos enterócitos, onde é esterificado e armazenado com triglicérides e apoproteínas. A dieta parece ser um importante determinante do conteúdo de colesterol sérico total. As lipoproteínas responsáveis pelo transporte do colesterol são diferenciadas pelo tamanho e densidade e são lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (VDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) (CHIU et.al, 2006).

As VLDL transportam os triglicéridos endógeno e colesterol para os tecidos e são hidrolisadas pela lipase protéica formando as LDL, que transportam o colesterol para as células extra hepáticas. As HDL transportam colesterol dos tecidos para o fígado. A concentração dessas proteínas está relacionada com a colesterolemia humana e podem causar riscos para doenças cardiovasculares. A modulação da colesterolemia pelo emprego de probióticos e prebióticos utiliza diversos mecanismos como; redução da absorção intestinal de colesterol, aumentando a excreção de esteróides fecais, bloqueando a síntese de colesterol ou favorecendo a sua excreção. Entretanto, esses mecanismos ainda não estão devidamente esclarecidos (FERREIRA et.al., 2003; VARAVALLO et.al., 2008; CHIU et.al., 2006).

#### 7.4 Outras situações clínicas

Os probióticos podem ser úteis ainda na redução da taxa de infecção por *H. pylori*, bactéria responsável por gastrites, úlceras e câncer de estômago, através da dieta com a inclusão de probióticos, Vasiljevic e Shah (2008), infecções urogenitais e vaginites, ação imunoestimulante, Varavallo et.al (2008), problemas dermatológicos (Tamime, 2003) e efeitos anticarcinogênico, JAY (2005), também foram relatados.

### 8 Eficácia e Segurança dos probióticos

A comissão da OMS/FAO, 2002, determinou as Diretrizes para Avaliação de Probióticos nos alimentos com o objetivo de recomendar critérios e

dos probióticos e para identificar e definir os requisitos mínimos para um produto ser identificado como probiótico.

Dentre as especificações para determinar se o microrganismo é probiótico ou não, é necessário:

- Identificar o gene, a cepa e a estirpe
- Realizar testes *In vitro* para demonstrar o potencial probiótico
- Realizar estudos *In vivo* usando animais e humanos

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence à bactéria deve ser de origem humana, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo ao nível do intestino (LIN et. al., 2006).

Os microrganismos probióticos devem ser suficientemente tolerantes ao suco gástrico e a bile e resistentes as enzimas digestivas, a fim de sobreviver à passagem pelo estômago e pelo intestino delgado superior em quantidade adequada (OOZER et. al, 2006).

A detecção de efeitos relevantes a saúde por meio de estudos clínicos em seres humanos é realizada de forma a atender critérios claramente definidos, casualizados, verificados por duplo cego e com controle de placebo.

Os resultados positivos devem ser confirmados por diferentes grupos de pesquisadores e publicados em revistas científicas criteriosas ou obtidos de acordo com as regras da boa prática clínica. Entretanto, um resultado positivo de um estudo clínico não é garantia de um efeito no indivíduo, mas indica qual porcentagem de um grupo de seres humanos pode ser beneficiada pelo consumo de alimentos probióticos em questão.

O período de passagem de um leite fermentado digerível pelo estômago é relativamente curto, de 1 a 2 horas em média. Os valores do pH no estômago variam dependendo do estado de nutrição, entre pH 1,5 (após um período de

rias probióticas necessitam ser testadas *in vitro* e *in vivo* quanto à tolerância ao suco gástrico e a bile (MARAGKOUidakis et. al., 2005).

## 8.1 Estudos *in vitro* para potencial probiótico

Testes *in vitro* são importantes para avaliar a segurança das bactérias probióticas e o mecanismo de ação do probiótico. Apenas testes *in vitro* não são suficientes para descrever determinadas cepas como probióticas. Probióticos para uso humano requer julgamentos em humanos (FAO/OMS, 2002).

Os principais testes utilizados atualmente *in vitro* para o estudo das cepas probióticas, segundo Tamime (2006) são:

- Resistência ao suco gástrico
- Resistência aos ácidos biliares
- Adesão a mucosa e/ou células intestinais humanas
- Atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas
- Resistência a antibióticos
- Imunomodulação
- Hemólise

Estudos *in vitro* com o objetivo de avaliar o potencial probiótico dos *Lactobacillus* sp pela capacidade de manter-se viáveis em condições ácidas e concentrações biliares, simulando as vias gastrointestinais demonstraram uma capacidade de sobrevivência de 100% em pH de 3,0 e 4,0 ao longo de 2 horas; em um pH de 2,0 a capacidade de sobrevivência foi reduzida em 2 ciclos de log; valores mais baixo e exposições mais longas levaram a diminuição na contagem (KARLSSON e MATTIASON, 2007; LIN et. al., 2005; MISHRA e PRASAD, 2005).

Em relação à bile, os *Lactobacillus* sp demonstraram uma tolerância extraordinariamente boa, melhor que a resistência ao *Bifidobacterium* sp (LIN et. al., 2005).

quisadores também examinaram o crescimento, a sobrevivência e manutenção da integridade celular dos lactobacilos e/ou bifidobactérias em vários meios de cultura, com adição de bile de boi a 0-0,3% ou sais de bile conjugados (ácido taurocólico e glicocólico). Descobriu-se que a estabilidade de ambas as cepas na bile é suficiente para sobreviverem à passagem pelo estômago e intestino delgado em percentuais elevados (MISHRA e PRASAD, 2005).

Estudos ainda sobre a adesão de bactérias ao tecido intestinal (Maragkoudakis et.al., 2005; Lin et. al, 2005; Mishra e Prasad, 2005; Minelli et. al., 2004) mostraram uma excelente adesão das bactérias probióticas aos diferentes tecidos nesses ensaios *in vitro*. Além disso, estudos sobre o comportamento da adesão bacteriana foram usados para investigar a capacidade de diferentes culturas probióticas de proteger células intestinais contra infecção por bactérias patogênicas. Foi detectada uma inibição na aderência da *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (mais de 60%) pelos *Lactobacillus casei* subsp. *Shirota*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e trofozoítos da *Giardia* (SHUKLA et. al., 2008).

Estudos demonstraram efeito da bacteriocina 20079, produzida pelo *Lactobacillus acidophilus* sobre uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii*, subs. *bulgaricus*. As três diferentes concentrações da bacteriocina utilizada levaram a reduções do número de células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii*, subs. *bulgaricus* o que indica que a atividade bactericida da bacteriocina foi concomitante com lise celular (DERAZ et. al., 2007; MISHRA e PRASAD, 2005).

Assim, a partir desses ensaios *in vitro*, é possível concluir que a taxa de sobrevivência dos *Lactobacillus* sp e *Bifidobacterium* sp durante a passagem gastrointestinal é alta quando administrados via produtos lácteos fermentados.

## 8.2 Estudos *in vivo* em animais e humanos

Modelos animais existem para fornecer subsídios dos efeitos *in vitro* e a determinação do mecanismo probiótico. Utiliza a administração diária de altas doses de probióticos e avalia a perda de peso, inflamação intestinal, alteração

o e cólon. É necessário realizar estudos em animais antes de fazer experimentos em humanos, no entanto, eles não simulam necessariamente a situação humana (REID, 2006).

O principal resultado de estudos sobre a eficácia de probióticos deve ser comprovado em benefícios humanos, tais como a melhoria estatisticamente e biologicamente significativa dos sintomas, bem-estar, qualidade de vida, redução do risco de doença ou de um tempo maior para a próxima ocorrência, ou recuperação mais rápida da doença. Cada um deverá ter uma comprovada correlação com o probiótico testado (FAO/OMS, 2002).

O experimento em humanos é realizado em quatro fases. A primeira fase avalia a segurança, a segunda e terceira fases avaliam a eficácia e a quarta fase avalia a vigilância (FAO/OMS, 2002).

Estudos sobre o metabolismo do colesterol entre o hospedeiro e a microbiota intestinal foram realizados utilizando ensaios experimentais com animais. Em todos os ratos tratados observou-se uma redução de triglicéridos, colesterol total, HDL (*High density lipoprotein*) e LDL (*Low density lipoprotein*), transaminases e bilirrubina. Parâmetros hematológicos e microbiológicos indicaram que cepas de *L. casei* possuem estirpes específicas para as funções probióticas. Pode-se observar o efeito hipocolesterêmico dos leites fermentados (MINELLI et. al., 2004).

Estudos em experimento humano analisaram as fezes de crianças e adultos após a ingestão de leites fermentados. As taxas de sobrevivência íleal e fecal dos Lactobacilos ingeridos foram em torno de 51,2% e 28,4% respectivamente. Em recém nascidos a sobrevivência dos Lactobacilos nas fezes foi maior (em torno de 92%). Os níveis populacionais de dois grandes grupos de bactérias fecais (*Bacteroides* ssp, *Provatella* ssp e *Clostridium cocoides*) tenderam a mudar em resposta a ingestão de leites fermentados. Os resultados sugerem que a comunidade bacteriana fecal pode ser alterada pela ingestão de cepas específicas probióticas (UYENO et. al., 2008; MARZOTTO et. al., 2006; FUJIMOTO et. al., 2008; OOZUR et. al., 2006).

## 9 Rotulagem

Os leites fermentados são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do 1º artigo da lei 1.283/1950, portanto o registro e rotulagem devem atender as instruções normativas específicas. Os rótulos dos produtos devem estar de acordo com os critérios do *Regulamento técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado* do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2005).

Os leites fermentados que possuem alegação funcional, devem ter seus rótulos avaliados de acordo com a *Resolução ANVISA/MS 18/99* e com alterações obrigatórias apresentadas no sítio eletrônico da ANVISA ([WWW.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://WWW.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno_lista_alega.htm)) divulgada no mês abril de 2008.

A informação nutricional é obrigatória na rotulagem e deve estar de acordo com a *RESOLUÇÃO - RDC Nº 360 da ANVISA/MS* (Brasil, 2003), que torna obrigatória a informação da rotulagem nutricional nos produtos embalados. Devem ser declarados os seguintes nutrientes: valor energético (kcal), carboidratos (g), proteínas (g), gorduras totais (g), gorduras saturadas(g), gorduras trans(g) e sódio (mg).

Qualquer informação ou propriedade funcional e/ou de saúde de um alimento ou ingrediente veiculado por qualquer meio de comunicação, não pode ser diferente daquela aprovada para constar em sua rotulagem (BRASIL, 1969; BRASIL 1999d). Entretanto, não é o que se observa nos produtos comercializados.

De acordo com Oliveira (2008), 70% dos leites fermentados probióticos analisados apresentaram irregularidades no rótulo quanto á denominação do produto, ilustrações, declarações de estimulantes e/ou promotores de saúde, presença de sinais, símbolos e emblemas.

Coeuret et. al. (2004) analisaram dez produtos probióticos destinados ao consumo humano. Cinco produtos foram erradamente rotulados quanto à

três em relação à espécie do microrganismo. Em quatro produtos, as cepas especificadas não foram detectadas. Quatro produtos comercializados sob três diferentes marcas registradas tinham a mesma cepa que foi nomeada diferentemente em cada rótulo.

Gueimond et. al (2004) identificaram todos os probióticos anunciados no rótulo de leites fermentados analisados, e ainda em dois leites fermentados foi encontrado um grupo de *Lactobacillus sp* adicional, que não estava declarado no rótulo.

Dos diversos leites fermentados disponíveis no mercado brasileiro, apenas alguns contêm no rótulo a identificação do microrganismo presente. Em geral o fabricante limita-se a informação que o produto contém %fermentos lácticos+. No entanto a linhagem de microrganismos presente no produto, bem como o número de células viáveis desta cultura , é que determina se esta é ou não funcional.

Os produtos comercializados que tem alegação funcional comprovada, não podem ser certificados porque não existem métodos oficiais de contagem e identificação de cepas bacterianas pelas agências reguladoras, que possam comprovar o que está declarado em rótulo, apenas o que é alegado pela própria empresa.

## 10 Aspectos legais . Brasil

São competências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): estabelecer normas, acompanhar e executar as políticas, as diretrizes e as ações de vigilância sanitária; conceder registros de produtos, segundo as normas de sua área de atuação; controlar, fiscalizar e acompanhar, sob o prisma da legislação sanitária, a propaganda e a publicidade de produtos submetidos ao regime de vigilância sanitária (BRASIL, 2000).

Somente em 1999, a ANVISA aprovou as Resoluções nº16, 17, 18 e 19 sobre a regulamentação técnica para análise de novos alimentos e ingredientes

s de propriedades funcionais e ou de saúde cuja  
essência é:

- Resolução ANVISA/MS 16/99 trata de procedimentos para Registro de alimentos e ou novos alimentos, cuja característica é de não necessitar de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para registrar um alimento, além de permitir o registro de novos produtos sem histórico de consumo no país, assim como, novas formas de comercialização para produtos já consumidos (BRASIL, 1999b).
- Resolução ANVISA/MS 17/99 estabelece as diretrizes básicas para avaliação de Risco e Segurança de Alimentos baseado em estudos e evidências científicas, se o produto é seguro sob o ponto de vista de risco a saúde ou não (BRASIL, 1999c).
- Resolução ANVISA/MS 18/99 aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou saúde, alegados em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999d).
- Resolução ANVISA/MS 19/ 99 aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999e).

Essas resoluções fazem distinção entre alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde.

**Alegação de propriedade funcional:** é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que uma substância (nutriente ou não) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

**Alegação de propriedade de saúde:** é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

ação da Alegação de propriedades funcionais e /ou de saúde, segundo as resoluções da ANVISA nº 18 e nº 19, descrevem o seguinte:

- A alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde é permitida em caráter opcional.
- O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.
- São permitidas alegações de função e ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração de eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem (BRASIL, 1999d).
- No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e da segurança do uso, segundo as Diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos.

Para ser registrado como alimento funcional deve ser comprovado à alegação de propriedades funcionais ou de saúde com base em:

- Consumo previsto ou recomendado pelo fabricante;
- Finalidade, condição de uso e valor nutricional, quando for o caso;
- Evidência(s) científica(s): composição química, com caracterização molecular, quando for o caso, e/ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e/ou fisiológicos e/ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as características do produto e comprovação de uso

população sem danos à saúde (BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c; BRASIL, 1999d ).

Os leites fermentados são regulamentados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1964), portanto o registro e demais requisitos do produto (contagem de bactérias para fabricação do produto, por exemplo) devem atender a instrução normativa nº 46 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2007).

Caso sejam utilizados microrganismos para os quais se deseja fazer uma alegação de propriedade funcional ou de saúde, esta alegação deverá ser submetida à avaliação da ANVISA/MS, através da Comissão de assessoramento Técnico-científico em Alimentos Funcionais (CTCAF), sobre o teor das alegações. A comissão enviará um parecer conclusivo das citadas alegações para a empresa com cópia para o MAPA.

As alegações aprovadas relacionadas à propriedade funcional e/ou de saúde a um nutriente ou não nutriente do alimento devem ser de acordo com as resoluções da ANVISA (Brasil, 1999d). No entanto a alegação no alimento deve ser avaliada caso a caso, tendo em vista que podem ocorrer variações na ação do nutriente ou não nutriente em função da matriz ou formulação do produto.

As alegações não devem fazer referência à prevenção, tratamento e cura de doenças (BRASIL, 1969; BRASIL, 1999e, BRASIL 2003).

A Gerência Geral de Alimentos (GGALI) da ANVISA juntamente com a comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) reavaliaram microrganismos anteriormente aprovados com alegação de propriedade funcional como probiótico.

Com esta revisão, os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, não são mais classificadas como probióticos, visto que são obrigatoriamente necessários à produção de iogurtes e que não são estritamente considerados probióticos, tendo em vista que esses microrganismos não colonizam o intestino.

avaliação das alegações anteriormente aprovadas, relacionados aos probióticos foram alterados. Em relação à quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores são aceitos desde que a empresa comprove sua eficácia.

A documentação referente à comprovação e eficácia deve incluir: Laudo da análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade, teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares.

Segundo o Regulamento técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado do Ministério da Agricultura, os produtos de origem animal embalados não devem ressaltar qualidades no rótulo que tenham benefícios a saúde (Brasil, 2005), enquanto a resolução da ANVISA/MS de nº 18 permite alegações no rótulo que fazem referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos não nutrientes e à redução de risco a doenças (BRASIL, 1999d ).

Dentre a documentação necessária para registrar um produto probiótico na ANVISA estão previsto o texto e a cópia do esboço com os dizeres da rotulagem do produto e as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedade funcional ou de saúde alegadas na rotulagem do produto.

Pode-se observar que o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura atuam de maneira paralela e desconexa e sem uma ação articulada e integradora de suas ações determinando um quadro grave de insegurança em relação aos alimentos consumidos no país.

Quanto á alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde serem permitidas em caráter opcional, a legislação deveria exigir que fosse veiculada essa informação no rótulo para que o consumidor pudesse escolher cepas potencialmente benéficas a saúde.

BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. *Brazilian Journal of food technology*, v.6, n.1, p.119 -126, 2003.

BENDALI, F.; GAILLARD-MARTINIE, B.; HEBRAUD, M.; SADOUN, S. Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *Food Science and Technology*, v. 41, n.10, p.1784 -1792, 2008.

BERMADEU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International journal Food Microbiology*, v.126, n.3, p.278-285, 2008.

BISCAIA, I.M.F.; STADLER, C.C.; PILATTI, L.A. Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas. XI SIMPEP . Bauru, SP, Brasil, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento técnico para Rotulagem de produtos de origem animal embalado. In SISLEGIS: Sistema de Legislação Agrícola Federal. Instrução Normativa Nº22 de 24 de Novembro de 2005. Publicado no Diário Oficial da União de 25 de Novembro de 2005. Disponível em: [WWW.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislação.do?operação=visualizar&id=14493](http://WWW.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislação.do?operação=visualizar&id=14493). Acesso em 11 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Institui Normas básicas para alimentos. Decreto-Lei nº 986 de 21 de outubro de 1969. Publicado no Diário Oficial da União de Outubro de 1969. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=Acesso> em 28 de maio de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Em VISALEGIS: Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Portaria nº398 de 30 de abril de 1999a. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=107&word=> .Acesso em 12 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Resolução nº16 de 30 de abril de 1999b. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=107&word=> .Acesso em 12 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Resolução nº17 de 30 de abril de 1999c. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=108&word=> Acesso em 12 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Resolução nº18 de 30 de abril de 1999d. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=109&word=> Acesso em 12 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Resolução nº19 de 30 de abril de 1999e. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110&word=> Acesso em 12 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Regulamento Técnico sobre os Padrões microbiológicos dos alimentos. RDC nº 02 de 02 de janeiro de 2001. Publicado no Diário Oficial da União de 10 de janeiro de 2001. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16613&word=>Acesso em 28 de maio de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Em VISALEGIS: Regulamento Técnico sobre Rotulagem de alimentos embalados. RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002. Publicado no Diário Oficial da União de 23 de setembro de 2002. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=12618&word=>Acesso em 15 de maio de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS: Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. RDC nº360 de 23 de dezembro de 2003. Publicado no Diário Oficial da União de 26 de dezembro de 2003. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=90598&word=>Acesso em 15 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. In VISALEGIS :Decreto n 3.029, de 16 de abril de 1999, alterado pelo decreto n 3.571, de 21 de agosto de 2000. Disponível em [47](http://e-</a></p></div><div data-bbox=)

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Algumas características associadas ao leite de má qualidade .Novas exigências para produção de leite. **EMBRAPA**. Viçosa, MG, p.23-31, 2001.

CARVALHO, A .; RIBEIRO, C. A. Introdução. **Ordenha mecânica: Implantação e Operação**. EMBRAPA. Viçosa, MG, p.19-36, 2008.

CARVALHO, A.; RIBEIRO, A.C. **Leite e Derivados**, EMBRAPA. Viçosa, MG, p.13-16, 2002.

CASTEELE, S.V.; VANHEUVERZWIJN,T.; RUYSSSENT,T.; VAN ASSCHE, P.; Huys, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters.**International Dairy Journal**. v.16, n.12, p.1470 - 1476, dez, 2006.

CHIU, C.; LU,T.; TSENG, Y .; PAN,T . The effects of Lactobacillus-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. **Applied Microbiology Biotechnologic** , v. 71, p. 238 - 245, 2006.

COLLADO, M.C. Role of probiotics in health and diseases. In: LEE, K.I.; SALMINEN,S. Handbook of probiotics and prebiotics , 2<sup>nd</sup> Ed.,New Jersey:Jonh wiley & Sons. p. 257- 375, 2009.

COEURET, V.; MICHELINE, G.; VERNOUX. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, França, v.97, n.2, p.147-156, dez. 2004.

DERAZ, S.F.; KARLSSON, E.N.; KHALILI, A.A.; MATTIASSON, B. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 373 - 379, 2007.

DONKOR, O.N .; NILMINI, S.L.I.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, Austrália, v.17, p.657 - 665, dez. 2006.

FARIA, C.P.; BENEDET, H.D.; LE GUERROUE, J. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n.3, p.511-516, 2006.

FERREIRA, C.L.L. Grupo de Bactérias lácticas - caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas.**Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Minas Gerais: UFV,p.7-39, 2003.

Food and Agriculture organization of the United Nations and World Health Organization. **Guidelines fot the Evaluation of Probiotics in Food**. London,

el em [www.fao.org/ag/agn/agns/micro\\_probiotics-esp.asp](http://www.fao.org/ag/agn/agns/micro_probiotics-esp.asp)—Acesso em 10 de dezembro de 2008.

FUJIMOTO, J.; MATSUKI, T.; SASAMOTO, M.; TOMII, Y.; WATANABE, K. Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain *Shirota* in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p. 210 - 215, 2008.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes Probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos. **Boletim de Biotecnologia**, 2002.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Viability and diversity of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations include in commercial fermented milks. **Food Research International**, v.37.I.09, p.839 - 859, 2004.

HANSEN, C. Culturas probióticas e suas propriedades. **Ha-La Biotec**, Ano XIII, n. 102, janeiro/fevereiro/março, 2008.

HOLTZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U.; Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v.35, n. 2 - 3, p.109 -116, 2002.

JAY, J.M. Parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento bacteriano. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 6.ed, cap. 3, p. 51-69, 2005.

KAO, Y.; LIU, Y.; SHYU, Y. Identification of *Lactobacillus spp.* in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food research international**, v.40, n.1, p.71-70, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, C. Survival of probiotics conventionally treated milk during storage. **Swiss Society of Food science and technology**, Australia, v.39, n.2, p.177-183, Jan. 2006.

LEE, K.L. Probiotics Microorganisms. In LEE, K.L., SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**, 2<sup>nd</sup>, Ed. New jersey: Jonh Wiley & Sons. P 03-176, 2009.

LIN, W.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v.23, n.1, p.74 - 81, 2006.

MARAGKOUidakis, P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potencial of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International dairy journal**, v.16, n.3, p.189 - 199, 2005.

MARCOS, A.; WARBERG, J.; NOVA, E.; GÓMEZ, S.; ALVAREZ, A.; ALVAREZ, R.; MATEOS, J.A. The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus*

response of subjects under academic examination stress. **Europe Journal Nutrition**, v. 43, p.381 - 389, 2004.

MARTIN, F.L. Armazenamento no iogurte comercial e o efeito na proporção das Bactérias lácteas. 2002. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARZOTTO, M. ; MAFFEIS, C.; T.; PATERNOSTER, T.; FERRARIO, R. ; RIZZOTTI, L.; PELLEGRINO, M.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. **Research in Microbiology**, v, p.857- 866, 2006.

MAYHEW, M. **The Journal for Nurse Practitioners**, v.3, n.4, p.272 - 273, 2007.  
MINELLI, E.B.; BENINI, A.; MARZOTTO, A.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v.14, p.723 -736, 2004.

MISHRA, V.; PRASAD, D.N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.1, p.109 -115, 2005.

NIELSEN, 2009. Nielsen News. Disponível em : <http://br.nielsen.com/site/index/shtml>. Em 20/06/2009.

NUTRA Ingredientes-USA.com. Brazil's functional foods market broaches. Disponível em <http://www.nutraingredients-usa.com/content/view/print/250443>. Em 20/06/2009.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciência**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v.23, p.172-176, 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, n.11-12, p.935 - 942, 2001.

OLIVEIRA, T.K.S.C. Análise Crítica de rotulagem de alimentos funcionais: Probióticos, fitosteróis e proteína de soja. 2008. Monografia (Graduação em Engenharia de alimentos) . Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2008.

OOZEER, R.; LEPLINGARD, A.; MATER, D.D.G.; MOGENET, A.; MICHELIN, R.; SEKSEK, I.; MARTEAU, P.; DORÉ, J.; BRESSON, J. ; Corthier, G. Survival of

MILK. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5615 - 5617, v.72, n.8, 2006.

OSTILIE, H.M.; TREIMO, J.; NARVHUS, J.A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. **International Dairy Journal**, v.15, n.10, p.989 - 997, 2005.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLUCKE, A.P.B. Probióticos. **Alimentos Funcionais**. São Paulo: Varela, p.14-20, 2005.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from Yogurts and fermented milk drinks. **Biotechnology techniques**, Australia, v.12, n.11, p. 819 - 821, nov. 1998.

REID, G. Safe and efficacious probiotics: what are they? **Trends in Microbiology**, v.14, n.8, p.348 - 352, 2006.

ROSA, M.C.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Revista Científica Uninove**, v.1, p.09 -15, 2002.

SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; FERNANDEZ-LOPZ, J.; AYAS- BARBERÁ, E ; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Incorporation of citrus fibers in Milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.13 - 21, 2008.

SHUKLA, G.; DEVI, P.; SEHGAL, R. Effect of *Lactobacillus casei* as a Probiotic on Modulation. **Small Intestine**, v.53, p.2671 - 2679, 2008.

T. MATTILA-SANDHOLM.; YLLARINEN,P.; CRITTENDEN,R.; G. MOGENSEN. FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, n.2-3, 2002, p.173 -182, 2002.

TABASCO, R.; PAARUP, T.; JANER, C.; PELAEZ.; REQUENA, T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, n.17, p.1107. 1114, 2007.

TAMIME, A.Y.; HASSAN,A.; FARNWORTW,E.; TOBA,T. Structure of fermented milk. In TAMIME, A.Y ,**Structure of Dairy Products**. Scotland, UK, 2007.

TAMIME, A.Y.; SKRIVER,A.; NILSSON,L.E. Starter Cultures. In TAMIME, A.Y .**Fermented Milks**. Scotland, UK: Blackwell Publishing, p.12 - 46, 2006.

TAMIME, A.Y. Microbiology of starter cultures. In ROBINSON, K .**Dairy Microbiology Handbook**, 3<sup>nd</sup> Ed., New York, p.261-346, 2002.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. Fundamentos del proceso de elaboración del yogur. In **Ciência y Tecnología**. Espanha: Zaragoza, p.7- 64, 1991.

Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, São José do Rio Preto, v.26, n.3, p.01 - 09, 2006.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. Impact of consumption of probiotic Lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.16 - 22, 2008.

VASILJEVIC, T.; SHAH, P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714 -728, 2008.

VERTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M.; GOOSSENS, H.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Safety assessment of *Lactobacillus* ssp strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.3, p.325 - 331, 2007.

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.12, n.7, p.579-589, 2002.

WEN-HSIN, L.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v.23, n.1, p. 74 - 81, 2006.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage, **International Dairy Journal**.v.17, n.8, p.1006 -1010, 2007.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação Sensorial, Microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados Contendo *Streptococcus Thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p.674 - 679, 2004.

## Capítulo 2 É Avaliação Físico-química e Microbiológica dos leites fermentados comerciais em armazenamento refrigerado.

Autora: Andrea Marta de Sena Lago  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Elisa Teshima

### Resumo

Foram analisadas 25 amostras de leites fermentados de cinco marcas diferentes, adquiridas nos supermercados da cidade de Feira de Santana/ BA, com a finalidade de caracterizá-los, quanto aos parâmetros físico-químicos (pH, acidez, gordura e proteína) e microbiológicos (bactérias lácticas, coliformes a 35°C e 45°C, bolores e leveduras) e avaliação da rotulagem. Os resultados foram comparados aos parâmetros do Regulamento Técnico de Leites Fermentados do MAPA, (Brasil, 2007) e as regulamentações da ANVISA. Duas marcas de leites fermentados analisados tinham alegação funcional, enquanto as outras marcas só declararam a presença de *Lactobacillus* sp. Duas marcas de leites fermentados apresentaram contagem de fungos filamentosos e leveduras acima do permitido pela legislação, caracterizando falhas no processo. Quanto à viabilidade das bactérias lácticas, verificou-se níveis acima de  $10^7$  UFC/g em todas as amostras. Uma amostra apresentou uso de aditivo não autorizado pelo regulamento supracitado. Os rótulos dos produtos analisados estavam de acordo com as exigências do Ministério da Agricultura, mas os leites fermentados com alegação funcional não se adequaram às exigências da ANVISA.

Palavra-chave: Bactérias probióticas, leites fermentados, legislação.

## Chapter 2 - Evaluation Physico-chemical and Microbiological fermented milk of commercial in refrigerated storage.

Author: Andrea Marta de Sena Lago

Adviser: Elisa Teshima

We analyzed 25 samples of fermented milk of five different brands, purchased in several supermarkets in the city of Feira de Santana / BA, in order to characterize them, on the physico-chemical parameters (pH, acidity, fat and protein) and microbiological (lactic acid bacteria, determination of (MPN) of coliforms at 35 ° C and 45 ° C and yeast) and to evaluate the labeling. The results were compared to the parameters of the Technical Regulation of fermented milk MAPA, (Brazil, 2007) and to the regulations of ANVISA. Two brands of fermented milk were analyzed for functional claim, while other brands only declared the presence of *Lactobacillus* sp. Two brands of fermented milk presented count of filamentous fungi and yeasts above the by law, indicating flaws in the process. The viability of lactic acid bacteria was up to  $10^7$  CFU/g in brands analyzed. One brand fermented milk presented unauthorized additive the Regulation. The labels of the products analyzed were in accordance with the requirements of the Ministry of Agriculture, but functional claim did not follow the ANVISA requirements

Keywords: probiotic bacteria, fermented milk, legislation.

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais fazem parte dos alimentos saudáveis, mais comercializados no Brasil, visto que no ano de 2007, foi detectado um crescimento de 8% das vendas em todo país. Os iogurtes probióticos foram os alimentos mais dinâmicos da categoria, com um crescimento de 26% (NIELSEN, 2008). Os leites fermentados probióticos constituem a categoria de alimentos funcionais que, além dos aspectos nutricionais, promovem benefícios à saúde, principalmente associados aos efeitos provenientes do equilíbrio da microbiota intestinal e conseqüentemente a diminuição de diarréias agudas, diarréias causadas por rotavírus e associadas ao uso de antibióticos, bem como, efeitos nos problemas da síndrome do intestino irritável (COLLADO, 2009).

De acordo com a cultura láctica empregada e o tipo de processamento, os leites fermentados podem apresentar diferentes características no produto final. Eles podem ser classificados em: iogurtes, leites fermentados ou cultivado, Kefir e Kumys, no entanto, só podem receber a denominação de "probióticos" se utilizar culturas lácticas probióticas com propriedade funcional demonstrada cientificamente *in vitro* e *in vivo*.

Em função do seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo, os gêneros mais utilizados são *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp*. (BARRETO et. al., 2002). Essas bactérias precisam atingir o sítio desejado, ativas e viáveis para alcançar os benefícios à saúde (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Os leites fermentados disponíveis no mercado são utilizados como veículos para bactérias probióticas, entretanto, nem sempre, asseguraram a viabilidade das bactérias, já que fatores ambientais exercem uma influencia nessas bactérias e podem comprometer a qualidade do produto final.

O controle de qualidade é um ítem indissociável da evolução do estado da arte de alimentos lácteos probióticos e prebióticos. Isto porque, para um produto obter a alegação de probiótico, por exemplo, precisa obedecer a uma série de

provação de seus benefícios à saúde. Um deles está relacionado à quantidade de microrganismos por porção consumida e, outro, à sobrevivência dos probióticos em condições semelhantes às dos processos digestivos humanos.

Diante dessa constatação, há necessidade de se estabelecer métodos específicos para identificar os probióticos e avaliar a população para determinar se eles podem ser eficazes, podendo então determinar a sua funcionalidade. No Brasil, ainda não existem métodos padronizados específicos para determinação da viabilidade e identificação bacteriana. O Regulamento Técnico para leites fermentados do MAPA, Brasil (2007), preconiza uma quantidade mínima de  $10^6$  UFC (Unidade formadora de colônias) por ml para bactérias lácticas, enquanto a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina a quantidade mínima de bactérias viáveis em torno de  $10^8$  e  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo. A alegação funcional para leites fermentados probióticos é opcional.

Portanto, essa pesquisa teve o objetivo de verificar as características físico-químicas, adequação da rotulagem, presença de contaminantes microbiológicos e a viabilidade de bactérias lácticas em leites fermentados comerciais, assim como o efeito das condições de armazenamento sobre esses parâmetros, durante a vida de prateleira estabelecida pelos produtores.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Amostragem

Foram avaliadas cinco marcas de leites fermentados, em cinco repetições, que declaravam a presença de lactobacilos vivos, sendo que a seleção desses produtos foi feita sem levar em consideração o fato de haver ou não alegação funcional em rótulo. As amostras foram coletadas nos supermercados da cidade de Feira de Santana-BA por um período de 6 meses (junho a dezembro de 2008) e foram avaliadas em dois diferentes momentos, no início e no final da validade declarada do produto.

Na aquisição das amostras considerou-se o prazo de validade, o lote de fabricação e as condições adequadas de refrigeração nos supermercados. As amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo reciclável até o laboratório, onde se deu o início das análises microbiológicas e físico-químicas.

TABELA 1. Características comerciais dos leites fermentados analisados.

Produto	Cepas declaradas	Validade declarada	Conteúdo líquido (ml)
Leite fermentado A	Sim	30 dias	80
Leite fermentado B	Sim	35 dias	80
Leite fermentado C	Não	35 dias	80
Leite fermentado D	Não	35 dias	80
Leite fermentado E	Não	60 dias	80

## 2.2 Avaliação Microbiológica

As amostras de leite fermentado foram submetidas à contagem de bactérias lácticas totais para determinação da viabilidade das cepas nos produtos. Também foram avaliados os níveis de microrganismos deteriorantes: Contagem de coliformes a 35\_C, coliformes a 45\_C e de bolores e leveduras. As metodologias utilizadas foram de acordo com aquelas sugeridas na Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2003).

Para a contagem de *Lactobacillus* sp foi utilizado o Ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), com plaqueamento em profundidade e incubação a 36\_C/72h em condições microaerofílicas. Nas análises em que as características das colônias no Ágar MRS deixaram dúvida sobre a identidade da cultura, estas foram isoladas e avaliadas quanto a coloração de Gram, catalase e morfologia.

Para a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes foi utilizado o Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), com plaqueamento em

a, incubados a 36°C/24h em aerobiose. Para a contagem de bolores e leveduras foi utilizado o Ágar batata dextrose a 3,5% (PDA acidificado), com plaqueamento em superfície e incubados 25°C por cinco dias em aerobiose.

## 2.3 Avaliação físico-química

Foram realizadas as seguintes determinações físico-químicas: pH (Potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0); acidez titulável (Titulação com Hidróxido de sódio (NaOH) padronizado); proteína, pelo método de *Kjeldahl* (determinação do nitrogênio total) e lipídios pelo método de *Soxhlet* (extração em éter etílico), de acordo com os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos do MAPA, (BRASIL, 2006) e pelas Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (PREGNOLATTO e PREGNOLATTO, 1985).

## 2.4 Avaliação da rotulagem

Para desenvolvimento desse estudo foi necessário realizar uma pesquisa documental com o objetivo de reunir informações relacionadas à legislação brasileira, às políticas públicas de saúde e alimentação, e uma pesquisa bibliográfica. A partir da pesquisa exploratória foi construído um banco com os dados da análise dos rótulos de leites fermentados com ou sem alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde comercializados na cidade de Feira de Santana. Após a coleta dos dados, seguiu-se a análise de frequência das informações obtidas.

## 2.5 Análise dos resultados

Para avaliação dos resultados das variáveis estudadas usou-se a análise de variância simples - ANOVA e de covariância . ANCOVA, seguidas de testes de comparações múltiplas de médias, quando a hipótese de igualdade de médias foi rejeitada pelo teste F da ANOVA ou ANCOVA. Para as variáveis, Lactobacilos, acidez, pH, proteína e gordura aplicou-se o teste de *Levene*, para a

... e o teste de *Shapiro-Will*. Para avaliação de contaminantes aplicou-se o teste de *Wilcoxon* para as duas amostras independentes.

### 3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos nas determinações microbiológicas e físico-químicas das 5 marcas comerciais de leites fermentados, no início e no final do prazo de validade estão apresentados na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

TABELA 2 - Resultados médios das determinações físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados no início do prazo de validade do produto disponível no mercado, BA, 2008.

Marcas	Parâmetros avaliados							
	Lactobacilos (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)		Bolores e Leveduras (UFC/mL)	Proteínas (g)	Gordura (g)	pH	Acidez (% ac. lático)
		35°	45°					
A	2,12 x 10 <sup>9a</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	2,03 <sup>a</sup>	0,18	3,65 <sup>a</sup>	0,97 <sup>a</sup>
B	1,1 x 10 <sup>9a</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,93 <sup>a</sup>	0,15	3,66 <sup>a</sup>	1,03 <sup>a</sup>
C	4,6 x 10 <sup>8b</sup>	< 0,1	< 0,1	7,3 x 10 <sup>3a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	0,17	3,95 <sup>b</sup>	0,84 <sup>b</sup>
D	1,2 x 10 <sup>9a</sup>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,66 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	3,57 <sup>c</sup>	1,06 <sup>a</sup>
E	2,04 x 10 <sup>8b</sup>	< 0,1	< 0,1	1,84 x 10 <sup>2b</sup>	1,30 <sup>b</sup>	0,11 <sup>b</sup>	3,80 <sup>d</sup>	0,72 <sup>b</sup>

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância.

#### 3.1 Viabilidade de *Lactobacillus sp*

Os Lactobacilos apresentaram-se viáveis em níveis superiores ao determinado pela legislação para todas as marcas analisadas. Essa quantidade bacteriana, determinada em unidade formadora de colônias (UFC) /mL variou de 2,04 x 10<sup>8</sup> a 2,12 x 10<sup>9</sup>. Pode-se observar que a maior quantidade corresponde à

nor contagem para o produto E, sendo que neste produto foi observado uma diminuição de 0,5 ciclo logarítmico na viabilidade de lactobacilos ao final da vida de prateleira.

Assim, do ponto de vista da contagem total de bactérias lácticas viáveis, os prazos de validade dos produtos se mostraram adequados, demonstrando que os fermentos lácticos utilizados são bem adaptados as condições de processo, mantendo a contagem viável acima de  $10^7$  UFC/g em todas as amostras analisadas. Vale salientar, que os produtos estavam em condições de temperatura controlada de armazenamento (4\_C), o que não ocorre com a maior parte dos produtos comercializados nos supermercados, onde muitas vezes ocorre interrupção da cadeia de frios, como descrito por Faria et. al. (2006), o que leva a uma redução na viabilidade dos lactobacilos nos leites fermentados analisados.

TABELA 3 - Resultados médios das determinações físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados no último dia de validade do produto disponível no mercado, BA, 2008.

Parâmetros avaliativos								
	Lactobacilos (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)		Bolors e Leveduras (UFC/mL)	Proteína (g)	Gordura (g)	pH	Acidez (% ac. láctico)
		35°	45°					
A	$1,76 \times 10^{9a}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	Na	Na	3,63	1,0
B	$1,06 \times 10^{9a}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	Na	Na	3,65	1,04
C	$2,26 \times 10^{8b}$	< 0,1	< 0,1	$1,3 \times 10^{4a}$	Na	Na	3,98	0,75
D	$9,9 \times 10^{8b}$	< 0,1	< 0,1	< 0,1	Na	Na	3,40	1,16
E	$5,8 \times 10^{7c}$	< 0,1	< 0,1	$3,72 \times 10^{2b}$	Na	Na	3,74	0,73

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância.

Na = Não analisado

Os níveis de viabilidade foram encontrados por Barreto et. al. (2003), em 117 amostras de leites fermentados analisados em diferentes estágios de vida-de-prateleira. Os autores obtiveram um valor médio para a contagem de  $10^7$  UFC/mL, e apenas 10 amostras apresentaram um valor médio abaixo de  $10^6$  UFC/mL, sendo que dessas, 4 apresentaram-se com menos de  $10^5$  UFC/ mL.

A população de bactérias lácticas viáveis na segunda análise, apresentou-se com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as marcas A e C; C e E; B e E; D e E; D e A; A e E.

No exame de caracterização das bactérias de todas as marcas dos leites fermentados analisados observaram-se bactérias GRAM positivas em forma de bacilos. Quando inoculadas no meio ÁGAR MRS e incubadas sob aerobiose, verificou-se o crescimento de colônias pequenas de cor creme clara, caracterizando, portanto, qualidades fenotípicas e fisiológicas típicas de *Lactobacillus sp*, semelhante ao descrito por Faria et. al. (2006).

A população de bactérias lácticas viáveis na segunda análise apresentou-se com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as marcas A e C; C e E; B e E; D e E; D e A; A e E.

Todos os produtos apresentaram redução na sua viabilidade bacteriana com o decorrer do tempo. Entretanto, as contagens da população dos lactobacilos permaneceram acima de  $10^6$  UFC/ mL, o mínimo exigido pelo regulamento técnico supracitado (BRASIL, 2007). Segundo Ravula e Shah (1998), essa população é a quantidade mínima necessária para os microrganismos probióticos exercerem efeito benéfico no organismo. As marcas A e B que apresentaram alegação funcional apresentaram-se com contagens acima de  $10^8$  UFC/mL de acordo com o valor especificado pela ANVISA.

Todas as 25 amostras das 5 diferentes marcas analisadas apresentaram resultados negativos (<01 UFC/mL), para enumeração de Coliformes a 35°C e 45°C nos dois períodos da análise.

Quanto à quantificação de bolores e leveduras presente nos leites fermentados analisados, as marcas C e E apresentaram um número acima do permitido pela legislação brasileira. Resultados semelhantes foram encontrados por Moreira et. al, 1999, que ao analisar em 72 amostras de leites fermentados encontraram 28% das amostras com concentração de leveduras acima de 100 UFC/g e entre essas, 7% demonstraram contagens da população acima de 1000 UFC/mL.

A presença de leveduras e fungos filamentosos nos leites fermentados é um indicativo de falhas higiênico sanitárias no processo de fabricação e/ou embalagem. Produtos adicionados com frutas são mais susceptíveis a contaminação e ao crescimento de leveduras. No presente estudo, o leite fermentado da marca C, declarou a presença de polpa de frutas na lista de ingredientes, o que pode ter favorecido a contaminação. As embalagens são importantes para proteger o alimento do meio externo, mas falhas no processo de embalagem podem também levar contaminação do produto. O leite fermentado E, foi o único produto a ter a embalagem de laminados mistos, o que pode ter favorecido a contaminação.

Sabendo que a contaminação do produto interfere nas características organolépticas e diminui a viabilidade do produto, Robinson (2002), sugere a aplicação de processos de controle nas indústrias, instalando os Procedimentos operacionais padronizados (POPs) e o sistema de Análises de perigos críticos de controle (APPCC), que são procedimentos preventivos baseados nas análises de riscos e ações corretivas no sistema operacional para assegurar a qualidade final do produto.

Os resultados obtidos nas determinações físico-químicas das 25 amostras de leites fermentados, por marcas codificadas, são apresentados nas Tabelas 2 e 3, sendo que a determinação de proteínas e gorduras foi realizada uma única vez durante o prazo de validade do produto.

Os valores de pH e acidez variaram entre 3,57 e 3,98 e entre 0,72 a 1,16 % de ácido láctico, respectivamente, nas duas mensurações. Os resultados encontrados para a acidez é o mesmo que Gomes e Macata (2001) cita para a tolerância dos *Lactobacillus* sp em termos de acidez do meio que varia entre 0,3 e 1,9 % (v/v) de acidez titulável. A marca do leite fermentado A que apresentou maior viabilidade de lactobacilos apresentou o menor teor de acidez em relação às marcas B e D.

Verificou-se que os valores de acidez aumentaram e os valores de pH diminuíram com o decorrer do tempo entre as marcas, essa variação só não foi observada na marca C. Essa característica pode ter sido atribuída a presença de aditivos (sorbato de cálcio) declarados no rótulo que pode ter tido uma ação neutralizante no leite fermentado. O valor do pH implica na atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer a um determinado grupo em detrimento de outro. Bactérias do gênero de *Lactobacillus* sp crescem e toleram bem a um baixo pH (MOREIRA, 1999).

Tamime e Robinson (1991) denominaram como pós acidificação a acidez produzida após o período de incubação, isto é, durante o resfriamento, estocagem e distribuição até o consumo. Essa acidez muda durante o armazenamento em maior ou menor grau, dependendo da acidez inicial do produto, da temperatura de armazenamento e do poder acidificante da cultura. No presente estudo, entre as marcas analisadas não se detectou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para acidez, entre as marcas B e C, A e C, D e B e A e B.

Considerando o limite mínimo de 2,9 gramas de proteína láctica por 100 gramas do produto, todos os leites fermentados apresentaram resultados menores do que o determinado pelo regulamento supracitado, entretanto os

ados. A proporção das substâncias alimentícias não lácteas como: açúcares, amidos e aromatizantes/saborizantes adicionadas apresentaram teores maiores que o resultado de proteínas lácteas. Das oito marcas de leites fermentados analisados por Rodas et.al, 2001, quatro apresentaram valores menores de proteínas que os valores indicados pelo Regulamento supracitado.

Verificou-se ainda que os teores de gordura variaram entre 0,1 a 0,6 % (Tabela 2). Sendo que foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre as marcas C e D. Todas as marcas atenderam a regulamentação específica, dentro da especificação do leite fermentado ~~desnatado~~. Segundo a legislação brasileira, em função do teor de gordura, os leites desnatados devem ter até 0,5% de gordura. Resultados semelhantes foram encontrados por Thamer e Penna (2006).

### 3.4 Avaliação de Rotulagem

A maior parte dos leites fermentados apresentou informações incompletas referentes aos microrganismos. Das cinco marcas analisadas, apenas duas marcas declararam o microrganismo no rótulo. A alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde é permitida em caráter opcional pela legislação brasileira. Algumas irregularidades são apresentadas na Figura 2.

Todos os produtos apresentaram a rotulagem nutricional de alimentos embalados de acordo com a RDC nº 360 da ANVISA/MS, Brasil (2003), sendo que nos produtos A e B as informações são declaradas na embalagem secundária. Os valores encontrados na análise de proteínas de todos os produtos investigados estavam diferentes dos especificado nos rótulos.

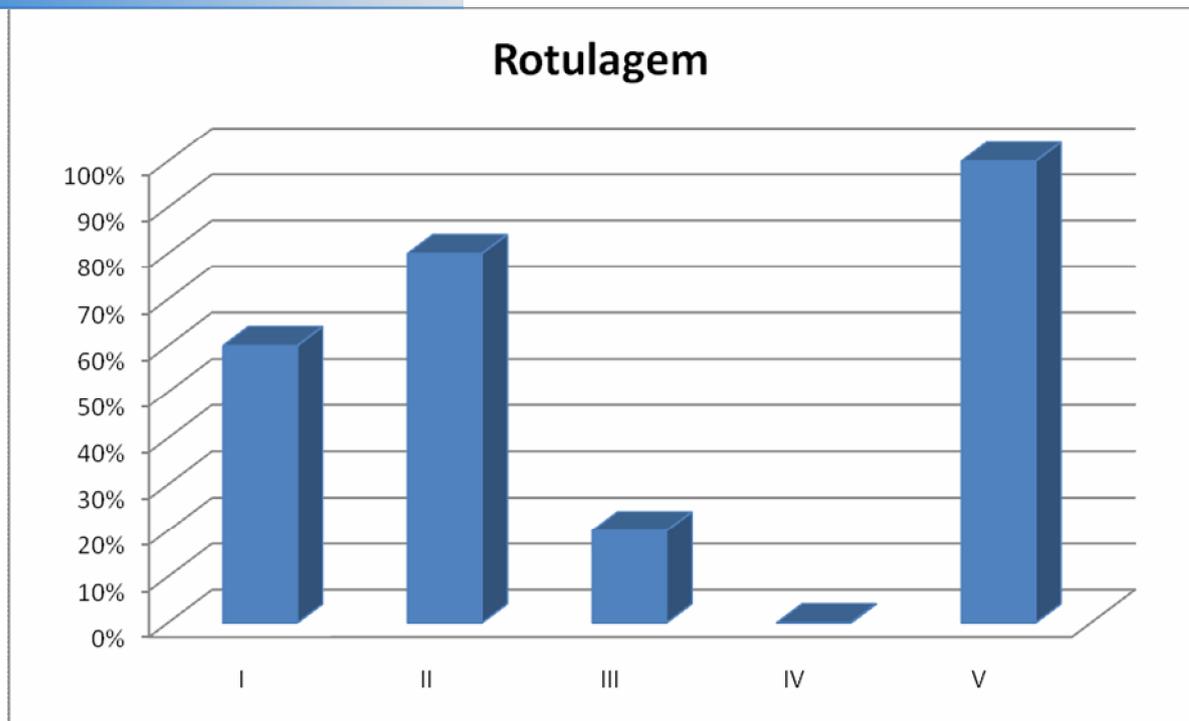
O Leite fermentado B foi adicionado do aditivo sulfato de zinco na sua formulação, sendo que este não está permitido pela legislação supracitada (BRASIL, 2005; BRASIL, 2007). O fabricante do leite fermentado C adicionou o aditivo Sorbato de Potássio que não consta da tabela de aditivos, mas como o fabricante também adicionou polpa de fruta no produto, o referido regulamento

ença de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio em uma concentração máxima de 300 miligramas por quilograma no produto final (BRASIL, 2007). Porém, por desempenhar uma função bacteriostática, esse aditivo poderia estar afetando a quantidade de bactérias benéficas que chegam ao trato gastrointestinal, o que prejudicaria a efetivação das ações esperadas em relação à saúde do consumidor.

Um fato curioso é que os leites fermentados comercializado nos Estados Unidos não apresentam na sua formulação quaisquer substâncias antimicrobianas, o que nos leva a pensar se existe ou não a necessidade de empregar estes aditivos na produção deste leite fermentado. O não uso de um conservante em um leite fermentado com agregado de polpa de fruta, promoveria uma deterioração mais rápida, porém, talvez isso pudesse ser resolvido através de boas práticas de fabricação (BPF) e um maior controle microbiológico durante o processo de produção deste produto.

Em relação aos benefícios imunitários, uma vez que ainda não estão absolutamente comprovados, não é correto que os produtores o usem na publicidade e nos rótulos. Também há controvérsia quanto à diminuição do teor de colesterol devido à ingestão de leites fermentados, o que não deveria ser anunciado nos rótulos. Esta é uma situação que merece maior atenção das entidades competentes, como a ANVISA.

Dentre as irregularidades observadas no rótulo dos produtos analisados (Fig. 2), constatou-se a presença de imagens, figuras inadequadas no rótulo de crianças, animais humanizados não permitidos pela legislação que podem passar um falso conceito do produto.



I-Alegação; II- Ilustrações inadequadas no rótulo; III- Aditivos; IV. Teor proteico; V-População de bactérias láticas( frase).

Figura 2. Irregularidades no rótulo dos leites fermentados.

#### 4 Conclusão

A maioria dos leites fermentados comercializados no Brasil ainda não contém ou não declara a presença de cepas probióticas no rótulo, apenas duas marcas investigadas fazem essa declaração, predominando leites fermentados produzidos por fermentos lácticos e *Lactobacillus* sp. De maneira geral, os níveis e a viabilidade de bactérias lácticas nesses produtos encontraram-se dentro dos limites mínimos recomendados pela legislação, indicando que as cepas presentes, mantiveram uma boa viabilidade durante o período de validade declarado em condições de temperatura controlada.

Os valores de pH diminuíram e os valores de acidez titulável aumentaram (exceto no produto 3) e mantiveram-se dentro dos valores próprios para leites



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

que o prazo de validade indicado pelo fabricante é adequado.

No que se refere aos parâmetros de higiene, algumas marcas não atenderam as exigências da Instrução Normativa nº 46 do MAPA, Brasil (2007), apresentando contagens de bolores e leveduras acima do mínimo aceitável, possivelmente por deficiência nos processos de controle no processamento de leites fermentados.

Todos os produtos analisados atenderam as especificações do Ministério da Agricultura, quanto aos aspectos da rotulagem, mas os produtos que declararam alegação funcional ainda não se adequaram as solicitações da ANVISA.

## Referência Bibliográfica

BARRETO, G.P.P.; SILVA, N.; SILVA, E.N. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp e bactérias totais em produtos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119 -126, 2003.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. In SISLEGIS: Sistema de Legislação Agrícola Federal. Instrução Normativa Nº68 de 12 de dezembro de 2006. Aprovado pelo Decreto nº 5351 de 21 de janeiro de 2005a. Disponível em: [HTTP://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao/visualizar&id=17472](http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao/visualizar&id=17472). Acesso em 11 de março de 2008.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. In SISLEGIS: Sistema de Legislação Agrícola Federal. Instrução Normativa Nº62 de 26 DE AGOSTO DE 2003. Publicado no Diário oficial da união de 18 de janeiro de 2003. Disponível em: [HTTP://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao/visualizar&id=2851](http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao/visualizar&id=2851). Acesso em 11 de março de 2008.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. In SISLEGIS: Sistema de Legislação Agrícola Federal. Instrução Normativa Nº46 de 23 de Outubro de 2007. Publicado no Diário Oficial da União de 24 de Outubro de 2007. Disponível em: [WWW.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=18164](http://WWW.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=18164). Acesso em 15 de março de 2008.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. Regulamento técnico para Rotulagem de produtos de origem animal embalado. In SISLEGIS: Sistema de Legislação Agrícola Federal. Instrução Normativa Nº22 de 24 de Novembro de 2005b. Publicado no Diário Oficial da União de 25 de Novembro de 2005. Disponível em: [WWW.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=14493](http://WWW.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=14493). Acesso em 11 de março de 2008.

COLLADO, M.C. Role of probiotics in health and diseases. In: LEE, K.I.; SALMINEN, S. Handbook of probiotics and prebiotics , 2<sup>nd</sup> Ed., New Jersey: John Wiley & Sons. p. 257- 375, 2009.

FARIA, C.P.; BENEDET, H.D.; GUERROU, J.L. Análise de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei* e suplementado com *Bifidobacterium longum*. **Ciências Agrárias**, Brasília, v 27, n.3, p.407- 414, mar. 2006.

FERREIRA, C.L.L. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. Minas Gerais: UFV, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE OF THE UNITED NATIONS (FAO)/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canadá, 2002. Disponível em [www.fao.org/ag/agn/agns/micro\\_probiotics-esp.asp](http://www.fao.org/ag/agn/agns/micro_probiotics-esp.asp)=Acesso em 18 de dezembro de 2008.

FUJIMOTO, J.; MATSUKI, T.; SASAMOTO, M.; TOMII, Y.; WATANABE, K. Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain *shirota* in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p. 210 - 215, 2008.

MOREIRA, S.R.; SCHWAN, R.F.; CARVALHO, E.P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em lavras . MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.1, p.01-09, 1999.

NUTRA INGREDIENTES - USA.COM. Brazil's functional foods market brochures. Disponível em <http://www.nutraingredients-usa.com/content/view/print/250443>. 1999.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciência**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLUCKE, A.P.B. Alimentos Funcionais. São Paulo: Varela, 2005.

PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v.1, cap.17, p.42-43, 1985.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from Yogurts and fermented milk drinks. **Biotechnology techniques**, Australia, v.12, n.11, p. 819-821, Nov.1998.

ROBINSON, K.R. Dairy Microbiologic Handbook. New York: Wiley - Interscience, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo, 3.ed: Varela, 2005.

TAMIME, A.Y. Probiotic Dairy Products. Scotland, UK : Blackell Publish, 2005.

TAMIME, A.Y. Probiotic Dairy Products. Society of Dairy Technology. Scotland: Blacwell Publishing, 2005.

VASILJEVIC, T.; SHAH, P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714 -728, 2008.

## Considerações Finais

Apesar dos diversos estudos clínicos realizados não terem conseguido provar definitivamente a eficácia desses microorganismos sobre a saúde, sabe-se que os mesmos exercem influências significativas sobre sintomas clínicos de determinadas doenças como alergia alimentar infantil.

Estudos clínicos como os citados anteriormente, têm demonstrado que cepas consideradas probióticas são capazes de sobreviver ao processo digestivo, sendo alguma 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).

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 vem resultando em produtos com alto grau de aceitabilidade, nos quais a sua viabilidade e aceitabilidade são mantidas.

As ações das agências de controle devem ser mais efetivas no setor regulado, quanto aos aspectos da qualidade do produto, a obrigatoriedade da alegação funcional para produtos probióticos, viabilidade, identificação de cepa, funcionalidade e um controle rigoroso das campanhas publicitárias desses produtos.



*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ANEXO

## Anexo 1

Tabela 4. Aditivos e Coadjuvante de tecnologia/elaboração, BRASIL, 2007.

NÚMERO (INS)	ADITIVO	FUNÇÃO	CONCENTRAÇÃO MÁX. NO PRODUTO	
		AROMATIZANTES / SABORIZANTES	q.s	
100	Cúrcuma ou curcuminha	CORANTE	80mg / kg	
101 i	Riboflavina		30mg / kg	
101 ii	Riboflavina 5- Fosfato de sódio		30mg / kg	
110	Amarelo ocaso FCF Amarelo sunsei		50mg / kg	
120	Carmim, Ácido carmínico, Cochinila		100mg/kg em ácido carmínico	
122	Azorrubina		50mg / kg	
124	Vermelho Ponceau 4R			
129	Vermelho 40, allura			
131	Azul patente V			
132	Indigotina, Carmim de Índigo			
133	Azul Brilhante FCF			
140 i	Clorofila			q.s
141 i	Clorofila cúprica			50mg / kg
141 ii	Clorofilina cúprica			50mg / kg
143	Verde indelével, Verde rápido fast green			50mg / kg
150 a	Caramelo I simples		q.s	
150 b	Caramelo II processo sulfito cáustico		q.s	
150 c	Caramelo III-processo amônia		500 mg /kg	
150 d	Caramelo IV processo sulfito . amônia		500 mg /kg	
160 ai	Beta-caroteno (sintético idêntico ao natural)		50 mg/ kg	

160 aii	Carotenóides, extratos naturais: Betacaroteno	CORANTE	50 mg/ kg
160 b	Annato, bixina, norbixina, Urucum, rocu		9,5 mg/kg como norbixina
162	Vermelho de beterraba		q.s
400	Ácido alginico	Espessantes / Estabilizantes	5g/kg isolados ou combinados
402	Alginato de sódio		
403	Alginato de potássio		
404	Alginato de cálcio		
405	Alginato de propileno glicol		
406	Agar		
407	Carragena (inclui a furcellarana e seus sais de sódio e potássio)		
410	Goma alfarroba, goma jataí Goma Garrofin, Goma caroba		
412	Goma guar		
413	Goma tragacanto, goma adragante tragacanto		
414	Goma arábica, goma acácia		
415	Goma xantana, Goma xantan, Goma de xantana		
416	Goma Karaya, Goma sterculia, Goma caráia		
418	Goma gelan		
425	Goma konjac		
461 i	Celulose microcristalina		
461	Metilcelulose		
463	Hidroxipropilcelulose		
465	Metiletilcelulose		
466	Carboximetilcelulose sódica		
440	Pectinas, pectina amidada		
-	Gelatina		
270	Ácido láctico	ACIDULANTES	
296	Ácido málico		q.s
330	Ácido cítrico		
334	Ácido tartárico		5g/kg

## Anexo 2

Tabela 5. Requisitos físico-químicos dos leites fermentados (BRASIL, 2007).

<b>Matéria gorda láctica (g /100g) (* Norma FIL 116 A :1987</b>				<b>Acidez (g de ácido láctico/100g) Norma FIL 150:1991</b>	<b>Proteínas lácteas (g/100)*</b>
Com creme	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado	0,6 a 2,0	Min. 2,9
Min. 6,0	3,0 a 5,9	0,6 a 2,0	Max. 0,5		

(\*) Os leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados poderão ter conteúdo de matéria gorda e proteínas inferiores, não devendo reduzir-se a uma proporção maior do que a porcentagem de substâncias alimentícias não lácteas, açúcares, acompanhados ou não de glicídios (exceto polissacarídeos) e/ou amidos ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou aromatizantes/saborizantes adicionados.

### Anexo 3

Tabela 6. Contagem de microrganismos específicos (BRASIL, 2007).

<b>Produto</b>	<b>Contagem de bactérias lácticas (ufc/g) Norma FIL 117A: 1988</b>	<b>Contagem de leveduras específicas (ufc/g) Norma FIL 94 B: 1990</b>
logurte	min. $10^7$ (*)	-
Leite cultivado ou fermentado	min. $10^6$ (*)	-
Leite acidófilo ou acidofilado	min $10^7$	-
Kefir	min $10^7$	min $10^4$
Kumys	min $10^7$	min $10^4$
Coalhada	min $10^6$	-

(\*) No caso em que se mencione o uso de bifidobactérias, a contagem será de no mínimo  $10^7$  UFC de bifidobactérias /g.

Tabela 7 Características dos produtos analisados com e sem alegação funcional.

Quesito avaliado	Com alegação funcional		Sem alegação funcional	
	Presença (por marca)	nº de produto	Presença (por marca)	nº de produto
1 - Inscrição no rótulo da informação % (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis+.	Não	—	Não	-
2 - Utiliza vocábulos, sinais, denominações, símbolos, emblemas, ilustrações ou outras representações gráficas que possam tornar a informação falsa, incorreta, insuficiente, ou que possa induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou engano, em relação à verdadeira natureza, composição, procedência, tipo, qualidade, quantidade, validade, rendimento ou forma de uso do alimento?	Não	—	3	15
3 - Ressalta qualidades que possam induzir a engano com relação a reais ou supostas propriedades terapêuticas que alguns componentes ou ingredientes tenham ou possam ter quando consumidos em quantidades diferentes daquelas que se encontram no alimento?	Não	—	3	15
4 - Indica que o alimento possui propriedades medicinais ou terapêuticas?	Não	---	Não	—
5- Possui a quantidade especificada do probiótico, contida na recomendação diária do produto pronto para o consumo?	Não	—	Não	-
6 - Aconselha seu consumo como estimulante, para melhorar a saúde, para prevenir doenças ou com ação curativa?	1	5	1	5

FONTE: Pesquisa experimental adaptado de Oliveira, 2008.