

VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS CASEI* EM ALIMENTO PROBIÓTICO INFANTIL RELACIONADA A VIDA-DE-PRATELEIRA

LACTOBACILLUS CASEI VIABILITY IN CHILD PROBIOTIC FOOD RELATED TO SHELF-LIFE

Hungria TD* & Longo PL**

RESUMO: Atualmente além dos efeitos nutricionais a população busca alimentos com efeitos benéficos a sua saúde. O consumo de alimentos probióticos por crianças e adultos tem como função o estabelecimento de uma microbiota que contribui para a atividade saudável do intestino. Estes alimentos possuem prazo de validade de vencimento menor que os produtos convencionais e muitas vezes, são consumidos com a data vencida. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar, através de cultivo microbiológico, a viabilidade de bactérias probióticas (*Lactobacillus casei*) presentes em um alimento probiótico infantil relacionada a vida-de-prateleira indicada pelo fabricante. As culturas foram realizadas em ágar Rogosa, as amostras do alimento foram semeadas por *Pour plate* dez dias antes da data de vencimento, na data e dez dias após a data. As placas foram incubadas em chama de vela e foi realizada a contagem de UFC viáveis. Foi possível observar diminuição do número de microrganismos probióticos viáveis conforme a progressão do tempo da vida-de-prateleira e dez dias após o vencimento, apesar das características organolépticas do produto encontrarem-se inalteradas, a quantidade de microrganismos viáveis não atingia o mínimo exigido pela Legislação vigente indicando que o consumo de tais produtos, fora do prazo de validade, além de poder trazer desconfortos intestinais, não confere os benefícios esperados.

PALAVRAS-CHAVE: Probióticos. *Lactobacillus casei*. Vida-de-prateleira

ABSTRACT: Nowadays the population is seeking, beside nutritional effects, food with beneficial effects on their health. The consumption of probiotic foods by children and adults has a role to establish a microbial activity which contributes to the healthy intestine. These foods have a lower shelf-life when compared to conventional products and often are consumed in expired date. This study aimed to examine, through microbiological culture, the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus casei*) in a food probiotic infant related to shelf-life indicated by the manufacturer. Cultures were performed on Rogosa agar; samples of food were plated by *Pour plate* ten days before the expired date, on the date and ten days after the date. Plates were incubated in the candle flame and it was performed the count of viable CFU. It was observed that the number of viable probiotic microorganisms decreased as progressed time of the shelf-life and ten days after the expired date, despite the characteristics of the products are unchanged, the amount of viable microorganisms not reached the minimum required by Legislation stating that the consumption of such products, out-dated, can cause intestinal discomfort and do not confer the expected benefits.

KEYWORDS: Probiotics. *Lactobacillus casei*. Shelf-life.

INTRODUÇÃO

A alimentação é uma necessidade fundamental de todos os seres vivos heterotróficos. A partir do alimento são supridas necessidades nutricionais, de desenvolvimento e de crescimento de qualquer forma de vida.

A necessidade de vencer novos desafios através do tempo acaba por refletir no estilo de vida dos seres humanos e influenciar no interesse de novos conceitos da nutrição, com alimentos que além de saciar a fome tem efeito benéfico para a saúde¹.

O conhecimento da importância que os componentes dos

alimentos têm na atividade fisiológica do organismo vem contribuindo para uma preocupação e interesse mundial em melhorar ainda mais a qualidade da nutrição e reduzir gastos com saúde garantindo um trabalho de prevenção de doenças e aumento da expectativa de vida dos seres vivos. O número de mortes provocado por câncer, enfermidades hepáticas, acidentes cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais dentre outros, pode ser reduzido se o emprego de bons hábitos alimentares for praticado².

Assim, o conceito de nutrição otimizada por alimentos funcionais, ou seja, que conferem benefício à saúde, além dos nutrientes básicos, é cada vez mais estudado partindo da idéia de

* Thaís DÁvila Hungria – aluna do curso de Ciências Biológicas da Universidade Braz Cubas (UBC); e-mail: azulsolar@gmail.com

** Priscila Larcher Longo – Professora Doutora em Microbiologia (ICB/ USP). Professora e Pesquisadora em Microbiologia da Universidade Braz Cubas (UBC); e-mail: pllongo@usp.br

que a dieta alimentar pode influenciar na manutenção da saúde controlando várias funções orgânicas de um indivíduo. Um exemplo disso é a capacidade de certos alimentos funcionais de elevar o número de bifidobactérias no cólon, aumentar a tolerância à lactose além de modular o sistema imunológico³.

Os primeiros estudos científicos sobre o tema vieram a partir de Eli Metchnikoff no início do século XX, um microbiologista russo que estudou os benefícios do leite fermentado e postulou a teoria de que o consumo diário de leite fermentado propiciava o prolongamento da vida dos camponeses búlgaros⁴.

Os termos “nutracêuticos”, “terapêuticos” e “medicinais” são utilizados para os alimentos funcionais devido aos efeitos fisiológicos positivos que estes desempenham no organismo humano².

O trato gastrointestinal humano possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do organismo, a não ser que microrganismos prejudiciais e patogênicos o dominem. Daí a importância em se manter o equilíbrio da microbiota residente do local o que pode ser conseguido através de suplementação com alimentos funcionais na dieta¹.

A dieta humana é muito rica e inicia-se na amamentação. Estudos mostram que o colostro humano é o primeiro alimento funcional do tipo probiótico que o organismo tem contato, considerando os microrganismos transmitidos da mãe para o filho durante a amamentação natural que colonizam efetivamente o trato intestinal do recém-nascido e assim desempenham um papel importante de imunização⁵.

Dentro da alimentação humana, são considerados funcionais os alimentos integrais, fortificados, enriquecidos e melhorados que beneficiam a saúde do organismo se consumidos regularmente e variadamente. Tais alimentos podem ser classificados em prebióticos, probióticos e simbióticos⁶.

Os prebióticos podem ser definidos como ingredientes seletivamente fermentáveis, não-digeríveis que possibilitam mudanças na composição e na atividade da microbiota intestinal, proporcionando ótimos resultados ao bem estar e à saúde do hospedeiro^{7,8}.

Esse tipo de alimento pode ser representado por um oligossacarídeo encontrado no leite humano, um frutooligossacarídeo encontrado em frutas e hortaliças, um carboidrato de alto peso molecular que afeta positivamente o hospedeiro e também pela inulina, obtida a partir da raiz da chicória, que apesar de ser uma fibra solúvel, oferece muitos benefícios nutricionais ao sistema digestório, aumentando o número de bifidobactérias e inibindo microrganismos patogênicos^{7,9}.

Komatsu et al. (2008)⁸ afirmam que para se garantir a eficiência dessa atividade prebiótica é necessário o consumo diário de 4g a 5g até no máximo 20g de inulina ou oligossacarídeo

por no mínimo 15 dias. Essa quantidade garante o estímulo de crescimento das bactérias *Bifidobacterium* no cólon humano.

Os alimentos probióticos são aqueles que possuem suplementos microbianos vivos na quantidade adequada e influenciam o organismo positivamente, além de aumentar o valor nutricional e terapêutico dos alimentos por garantir equilíbrio no trato gastrointestinal do hospedeiro¹.

Além do consumo de alimentos probióticos na nutrição humana (crianças e adultos), existem estudos de culturas funcionais sendo administradas em rações para animais. Estes mostram que os probióticos podem ser benéficos a filhotes de cães desmamados precocemente, além de servirem como suplemento alimentar em rações para porcos e para aumentar o desempenho produtivo de rês-touro^{10,11,12}.

Os alimentos probióticos atuam no organismo inibindo a colonização do trato intestinal por bactérias patogênicas ao produzir substâncias bactericidas, competir por nutrientes e aderir à mucosa intestinal estimulando a ação do sistema imunológico³.

Culturas probióticas também são utilizadas na tecnologia alimentícia por garantir um melhor sabor em alguns produtos finais de industrialização devido à redução da acidez durante o armazenamento e estocagem do mesmo. São considerados alimentos probióticos para humanos os leites fermentados, iogurtes, alguns tipos de leite integral e queijos^{13,14}.

Os suplementos microbianos que aumentam o valor nutritivo e benéfico dos alimentos incluem diversos gêneros, entre os mais usados e eficazes estão *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*¹³.

As bifidobactérias produzem ácido acético e láctico a partir da fermentação de açúcares. Essas bactérias prevalecem no intestino e suas propriedades têm eficiência na prevenção de colonização de bactérias patogênicas neste sítio. As espécies mais utilizadas são *Bifidobacterium bifidus*, *B. longus*, *B. animalis* e *B. infantis*^{3,15}.

O gênero *Lactobacillus* abriga colonizadores que vão desde a boca, trato intestinal e vagina humana até laticínios, alimentos deteriorados e produtos vegetais. São bactérias gram positivas que não possuem citocromos, não formam esporos e são estritamente fermentativas e anaeróbias. Dentre os lactobacilos mais utilizados na indústria alimentícia destacam-se os acidófilos *Lactobacillus casei*, *L. bulgarico*, *L. lactis* e *L. plantarum*^{3,16}.

Há registros de que *L. casei* é a bactéria probiótica mais utilizada na produção de leites fermentados e de outros alimentos lácteos devido ao seu poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal após sua ingestão garantindo efeito benéfico ao indivíduo que o consumiu⁵.

Algumas culturas probióticas devem ser utilizadas em

quantidades limitadas na produção de leites fermentados, pois existem substâncias produzidas por esses microrganismos que podem ocasionar sabores desagradáveis ao produto final¹⁷.

Os alimentos simbióticos são representados por uma mistura de alimentos prebióticos e probióticos que acarretam benefícios ao hospedeiro melhorando a sobrevivência de células microbianas vivas no trato gastrointestinal e consequentemente melhorando a saúde do indivíduo^{2,6,18}.

Atualmente o setor lácteo tem como principal preocupação a funcionalidade de seus alimentos. Consequentemente, há aumento nas pesquisas e formulações para a fabricação de grande variedade de produtos que garantam os benefícios do leite e seus derivados^{7,8}.

Nos Estados Unidos da América, até 2002, 36% dos alimentos convencionais foram modificados para funcionais para atender ao interesse demonstrado pelo consumidor, na Europa este número corresponde a 18%, enquanto no Brasil, de 1996 a 2002, a mudança ocorreu em apenas 1% dos produtos¹⁹.

Empresas alimentícias de laticínios têm adotado a prática de inserir bactérias probióticas em leites fermentados e outros produtos. Fatores importantes como interação entre as espécies, acidez do iogurte, oxigenação, condições de fermentação, pH do produto, práticas de inoculação, temperatura e também as condições de estocagem e armazenamento influenciam diretamente na sobrevivência da microbiota probiótica desses alimentos lácteos fermentados.

De acordo com Sivieri & Oliveira (2002)¹⁹, o tempo estabelecido como ideal para vida-de-prateleira de bebidas lácteas é 28 dias. A vida-de-prateleira de um produto probiótico é definida pelo tempo de produção e embalagem até o momento em que o produto esteja impróprio para consumo, ou seja, com o prazo de validade vencido.

Para a indústria alimentícia, o curto tempo de vida-de-prateleira de iogurtes e leites fermentados é um desafio para se superar, principalmente porque a comercialização desses produtos normalmente é feita em embalagens múltiplas de seis a doze embalagens individuais contidas em uma embalagem principal e o consumo desses probióticos é mais lento que os alimentos básicos. Assim, os consumidores acabam jogando fora o produto ou então consumindo o produto com a data de validade vencida⁸.

As culturas probióticas dos alimentos funcionais possuem efeito terapêutico ao organismo do homem, principalmente quando se fixam na parede do cólon. Para isso, é necessário que as bactérias estejam viáveis nesses alimentos durante a vida-de-prateleira e ainda sejam ingeridas regularmente para que se tenha o efeito pretendido²⁰.

Devido à importância dos microrganismos vivos dos

alimentos probióticos na alimentação humana, associado ao desperdício de alimentos jogados fora e ao hábito de consumo de produtos com data de validade vencida, justifica-se a realização desse estudo, no qual a análise da viabilidade de bactérias probióticas será comparada em cultura em diferentes períodos relativos à data de validade indicada no rótulo da embalagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do alimento probiótico

O alimento probiótico utilizado neste estudo tratava-se de leite fermentado para crianças. O produto foi obtido em um supermercado de Mogi das Cruzes, localizado próximo ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Braz Cubas, onde foi processado o estudo.

O produto selecionado estava disposto em uma embalagem plástica principal, com 6 unidades de 80g, com a identificação “Leite Fermentado Desnatado Adoçado” e com as informações da data de fabricação e data de vencimento, incluindo também a numeração do lote do alimento. Ainda na embalagem plástica principal, constava a informação de que o alimento possuía probióticos *Lactobacillus casei* na quantidade de 10^{10} a 10^{11} unidades formadoras de colônias (UFC) por 80g.

As embalagens de 80g apresentavam informação da existência de *Lactobacillus casei* vivos, acrescentando que todo leite fermentado possui microrganismos vivos, continha ainda descrição dos ingredientes e orientação para manter o alimento sob refrigeração de 1 a 10° C, além da data de fabricação, data de vencimento e número do registro do produto no Ministério da Agricultura.

Análise da viabilidade de *Lactobacillus casei*

A viabilidade dos microrganismos *Lactobacillus casei* presentes no leite fermentado para crianças foi analisada dez dias antes da data de vencimento indicada na embalagem, no dia do vencimento e dez dias após a data de vencimento.

O meio Ágar Rogosa foi preparado conforme instruções do fabricante (Himedia Laboratories – Mumbai, Índia), adicionou-se ácido acético glacial e o meio foi fervido por dois a três minutos. A amostra de leite fermentado probiótico foi diluída em solução salina (0,9% NaCl, pH 7,0) em série até 10^{-6} e alíquotas de 100µl foram colocadas em placas de Petri estéreis. O meio ágar Rogosa foi então adicionado (técnica de *Pour Plate*) e o material foi homogeneizado.

Para a recuperação em cultura dos microrganismos o meio Ágar Rogosa foi utilizado pois, de acordo com seu fabricante, este meio desidratado, seletivo e sólido é ideal para o cultivo de *Lactobacillus* orais e fecais, além de ser excelente para quantificar as bactérias em produtos salinos e lácteos.

Além disso, Komiyama (2003)²² afirma que o meio de cultura mais utilizado na contagem de lactobacilos é o Rogosa por conter Tween 80 e sais minerais misturados que são seletivos para estes microrganismos, proporcionando colônias características (discóides) que facilitam a contagem.

A técnica de semeadura de *Pour plate* foi usada de acordo com Pereira et al. (2007)²³ e Soave (2007)²⁴ que a utilizaram para avaliar a concentração de bactérias lácticas viáveis em iogurtes com polpa de frutas e verificar a atividade de bactérias lácteas sobre o soro de queijo, respectivamente.

Os controles, positivo e negativo das culturas foram obtidos com a semeadura de uma alíquota do leite fermentado sem diluição e de ágar Rogosa sem leite fermentado, respectivamente. O plaqueamento das diluições de 10^{-3} a 10^{-6} foi realizado em triplicata nas três fases da vida-de-prateleira do produto.

Após a adição do meio sobre as alíquotas das amostras pelo método *Pour Plate*, as placas foram mantidas semi-abertas próximas ao bico de Bunsen por 5 minutos e então foram incubadas em chama de vela a 37°C por cinco dias.

Após a contagem de número de UFC viáveis foi realizado o cálculo da quantidade de microrganismos viáveis por ml através da fórmula:

N° de UFC viáveis/ ml de produto = média de UFC da triplicata X Fator de diluição X 10

RESULTADOS

Após o período de incubação das placas semeadas com amostras do leite fermentado infantil foi realizada contagem de UFC em cada placa. Foi realizada a somatória e média do valor das UFC presentes nas três placas semeadas com amostras da mesma diluição (10^{-3} a 10^{-6}). Os valores estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios de UFC de *Lactobacillus casei* obtidos nos três momentos da vida-de-prateleira da amostra de leite fermentado infantil (10 dias antes do prazo da data de validade, na data do prazo de validade e 10 dias após a data do prazo validade).

CONTAGEM DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>			
Diluições	10 dias antes	na data	10 dias após
10^{-3}	> 300 UFC	56 UFC	1,66 UFC
10^{-4}	255 UFC	03 UFC	–
10^{-5}	53 UFC	–	–
10^{-6}	08 UFC	–	–

Estes valores foram utilizados para o cálculo da quantidade de microrganismos viáveis por ml de produto e foram obtidos os valores mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Quantidade média de *Lactobacillus casei* por ml de produto probiótico infantil nos três momentos da vida-de-prateleira (10 dias antes do prazo da data de validade, na data do prazo de validade e 10 dias após a data do prazo validade).

Vencimento da data de validade	UFC de <i>Lactobacillus casei</i> /ml de produto
10 dias antes	2,55 a 8×10^7 UFC/ml
na data	3 a $5,6 \times 10^5$ UFC/ml
10 dias após	$1,66 \times 10^4$ UFC/ml

DISCUSSÃO

Para que um alimento probiótico alcance sua funcionalidade, é necessário que atenda uma série de requisitos sendo o principal, a viabilidade dos microrganismos. Para que isso ocorra, as células viáveis probióticas devem estar em concentrações mínimas exigidas até o momento do consumo¹⁷.

A manutenção do número de células viáveis deve atender ao valor estabelecido pela legislação brasileira em vigor, segundo Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução Nº 5, 13 de novembro de 2000²¹. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/ml no produto final, durante o prazo de validade.

Neste estudo, a viabilidade dos *L. casei* presentes no leite fermentado para crianças, analisada dez dias antes do vencimento do prazo de validade, no dia do vencimento e dez dias após a data de vencimento foi determinada por cultivo e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Foi possível observar que no prazo de dez dias antes do vencimento da validade do produto, a recuperação de células viáveis variou de $2,55 \times 10^7$ UFC/ml a 8×10^7 UFC/ml, ou seja, manteve-se com 10^7 UFC/ml. Já na data de vencimento estes valores variaram de $5,6 \times 10^5$ UFC/ml a 3×10^5 UFC/ml, mantendo-se com 10^5 UFC/ml. No período após a data de vencimento estipulada na embalagem, só foi possível a recuperação de $1,66 \times 10^4$ UFC/ml. Estes resultados indicam que a quantidade de microrganismos viáveis diminui progressivamente no alimento probiótico estudado.

De acordo com Thamer & Penna (2005)¹⁴, o pH abaixo do ideal do alimento interfere na viabilidade das colônias probióticas reduzindo assim, a contagem das células viáveis de *Lactobacillus*. Outros fatores que podem acarretar diminuição ou interferência na viabilidade de microrganismos probióticos são controle inadequado da cultura, pontos falhos ou deficiência na manipulação ou até mesmo condições de estocagem incorretas²⁵.

Além disso, existem riscos ao consumidor que consome produtos fora da validade. Estes riscos podem estar associados ao aumento da acidificação do alimento que traz alteração na cor e sabor do produto devido a intensa produção de ácido láctico através da lactose pelos microrganismos presentes no alimento²⁶.

De acordo com Landgraf (1995)²⁷, o sabor, a cor e o odor do leite e seus derivados são facilmente alteráveis devido a multiplicação de microrganismos resistentes a processos de pasteurização ou ainda, de microrganismos que contaminaram o produto após o processamento térmico e de estocagem. Deve-se lembrar que além do aspecto visual e de sabor do alimento estas alterações podem ocasionar alguma disfunção ou desconforto no trato intestinal²⁵.

Além disso, entre as informações contidas na embalagem do alimento, estava o número de microrganismos viáveis: 10^{10} - 10^{11} UFC/ 80g de produto, ou seja, cerca de $1,25 \times 10^9$ UFC/ml. Estes números evidenciam que, apesar de ter se conseguido o crescimento dos *L. casei* neste estudo, o meio e as condições de cultivo não foram as ideais, já que o número máximo de

microrganismo recuperados foi de 8×10^7 UFC/ml.

Apesar da diferença do número de microrganismos viáveis obtidos em cultura e do número indicado na embalagem do produto, este estudo mostra claramente que há diminuição do número de microrganismos viáveis no alimento probiótico conforme a progressão do tempo-de-prateleira e se este produto for consumido fora do prazo de validade, não estará contribuindo com os benefícios probióticos esperados.

CONCLUSÕES

A recuperação de microrganismos lácticos viáveis neste estudo foi menor que a quantidade indicada na embalagem do produto, mas ainda dentro dos valores mínimos de viabilidade exigida pela legislação vigente. Além disso, houve diminuição da quantidade de microrganismos probióticos conforme a progressão do tempo-de-prateleira, indicando que o consumo de tais produtos deve obedecer à data de validade estipulada para que os benefícios probióticos sejam atingidos e não causem desconfortos à saúde intestinal do consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saad IMS. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Rev Bras Cien Far. 2006;42(1):2-16.
2. Stringueta CP, Rezende VCA, Guttierrez MPA, Badaró LCA. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana. Nutr Gerai – Rev Dig Nut. 2008;2(3):2-29.
3. Borges, CV. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg LD. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p.1495-1508.
4. Lerayer ALS, Salva TJG. Leites fermentados e bebidas lácteas. Campinas: ITAL;1997.
5. Novak RF, Almeida GAJ, Vieira OG, Borba ML. Colostró humano: fonte natural de probióticos? J Pediatr. 2001;77(4):265-70.
6. Costa BMN. Alimentos: componentes nutricionais e funcionais. In: Costa BMN, Borém A. Biotecnologia e nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos. São Paulo: Nobel; 2003. p. 31-59.
7. Bortolozzo QE, Quadros RHM. Aplicação de inulina e sucralose em iogurte. Rev Bras Tecnol Agroind. 2007;1(1):37-47.
8. Komatsu RT, Buriti ACF, Saad IMS. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. Rev Bras Cien Far. 2008;44(3):330-47.
9. Lorente FB, Serra DJ. Alimentos funcionais: probióticos. Acta Pediatr Espan. 2001;59(3):150-5.
10. Sanches LA, Lima FAJ, Fialho TE, Murgas SDL, Almeida CE, Neto VJ, et al. Utilização de prebiótico, probiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. Cienc Agrotec. 2006;30(4):774-7.
11. Gonçalves M, Maluta RP, Dahlke F, Maiorka A, Ávila FA. Avaliação da capacidade imunostimulante e da estabilidade de um probiótico empregado em rações de cães. Arch Vet Sci. 2007;12(2):25-30.
12. Dias DC, Stéfani MV, Ferreira CM, França FM. Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. Arch Zootec. 2008;57(220):449-55.
13. Gomes AMP, Malcata FX. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. Boletim de Biotecnologia Alimentar. 1999;64:12-22.
14. Thamer GK, Penna BLA. Efeito do teor, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias em bebidas fermentadas. Rev Bras Cien Farm. 2005;41(3):394-400.
15. Barbosa FHF, Silva MA, Martins SF, Nicoli RJ. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46. Rev Biol Cien Terra [periódico na Internet]. 2005 jul/set [acesso em 2009 abr 17]; 1(2):[aproximadamente 11p]. Disponível em: <http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/bacterias.pdf>
16. Buriti ACF, Saad IMS. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Arch Latin amer Nutr. 2007;57(4):373-80.

17. Macedo NL, Luchese HR, Guerra FA, Barbosa GC. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(4):935-42.
18. Oliveira BL. Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-químicas de leite fermentado simbiótico [Dissertação]. São Caetano do Sul: Instituto Mauá de Tecnologia Centro Universitário, Escola de Engenharia Mauá; 2008.
19. Sivieri K, Oliveira NM. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com "Fat Replacers" (Litesse e Dairy-Lo). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22(1):24-31.
20. Antunes CEA, Cazetto FT, Bolini AMH. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. *Alim Nutr*. 2004;15(2):107-14.
21. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem animal. *Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados*. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Publicada no Diário Oficial da União, Brasília (DF), 2000 nov. 27; Sec. 1:9.
22. Komiya YE, Jorge COA, Martins PAC, Balducci I, Koga-Ito YC. Avaliação do meio LAPTg como alternativa para o isolamento de *Streptococcus* do grupo *Mutans* e lactobacilos da saliva. *Rev Biociênc*. 2003;9(4):59-64.
23. Pereira AM, Almeida MD, Sauer E. Avaliação da concentração de bactérias lácticas viáveis em iogurtes com polpa de frutas. *Série Ciênc Tecnol Alim: Desenv Tecnol Alim*. 2007;1:7-13.
24. Soave BP. Acompanhamento da vida útil de bebidas lácteas: influência do soro do queijo e culturas contendo organismos probióticos. In: Educação brasileira: extinção ou sustentabilidade na universidade. 5ª Mostra acadêmica UNIMEP: Anais do 15º Congresso de Iniciação Científica em Educação Brasileira: Extinção ou sustentabilidade; 2007 out 23-25, Piracicaba, São Paulo: Universidade Metodista de Piracicaba; 2007. p. 1-8.
25. Moreira RS, Schwan FR, Carvalho PE, Ferreira C. Análise microbiológica e química de iogurte comercializados em Lavras MG. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999;19(1):1-12.
26. Silva VS. Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico [Dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Ciência e Tecnologia dos Alimentos; 2007.
27. Landgraf M. Deterioração Microbiana de Alimentos. In: Franco MGDB, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 1995. p. 93-108.