



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

ISABELA NOGUEIRA MARTINS SENA RIOS

**SOBREVIVÊNCIA DE MICRO-ORGANISMO PROBIÓTICO EM
MOUSSE DE MARACUJÁ**

BRASÍLIA

2016

ISABELA NOGUEIRA MARTINS SENA RIOS

**SOBREVIVÊNCIA DE MICRO-ORGANISMO PROBIÓTICO EM
MOUSSE DE MARACUJÁ**

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Santos Leandro

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Nutrição da UnB
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Nutrição.

BRASÍLIA

2016

ISABELA NOGUEIRA MARTINS SENA RIOS

**SOBREVIVÊNCIA DE MICRO-ORGANISMO PROBIÓTICO EM
MOUSSE DE MARACUJÁ**

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Santos Leandro

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Nutrição da UnB
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Nutrição.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Eliana Santos Leandro
(Orientadora)

Prof^ª. Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato

Prof^ª. Dra. Verônica Cortez Ginani

Este trabalho é dedicado à minha família e a todos que contribuíram, de alguma forma,
para meu crescimento pessoal e profissional durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, força e determinação para enfrentar essa jornada da minha vida, por ter me colocado neste maravilhoso mundo da nutrição, onde, através de caminhos por Ele planejados, pude me encontrar e me redescobrir em diversos aspectos da minha vida.

Agradeço a meus queridos pais, Joselia e Alexandre, por toda força, incentivo e amor incondicional depositados em mim durante este percurso e em toda minha existência. Por me incentivar a ser o melhor de mim mesma.

Aos meus amados irmãos, Letícia, Juliana e Alexandre por sempre me apoiarem e me ajudarem a superar todos os obstáculos que encontrei em minha jornada, e comemorarem junto a mim minhas conquistas.

À minha querida orientadora deste projeto, Profa. Dra. Eliana Santos Leandro, por toda sua paciência, boa vontade, atenção e experiência passadas a mim durante esta trajetória. Por ter me mostrado, de forma amiga e profissional, o quão significativa e importante é nossa contribuição neste ramo da ciência. Por sempre acreditar em mim.

Minha gratidão, também, às demais professoras do departamento de nutrição da Universidade de Brasília (UnB) por terem me mostrado, a partir de seus conhecimentos, atenção, experiência profissional e vivência pessoal na área, o quanto a nutrição é especial.

A minhas companheiras de curso, por caminhar junto a mim, com tanto carinho e bom-humor, na busca por nosso tão estimado sonho profissional.

À Universidade de Brasília, por ter me preparado, com toda sua magnitude, para os desafios da vida acadêmica, profissional e, conseqüentemente, pessoal.

RESUMO

SOBREVIVÊNCIA DE MICRO-ORGANISMO PROBIÓTICO EM MOUSSE DE MARACUJÁ

O aumento do interesse por probióticos pela população tem mostrado-se cada vez mais expressivo, assim como a quantidade de estudos que investigam os mecanismos de ação de tais bactérias. Os micro-organismos probióticos liofilizados apresentam-se como uma alternativa de consumo que pode ser explorada por diferentes pesquisas em diferentes alimentos. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de mousse de maracujá simbiótica, onde avaliou-se a sobrevivência destes micro-organismos neste produto ao longo do período de estocagem em condições de refrigeração, identificando se este é um bom veículo para estes micro-organismos. A análise foi realizada em mousse com adição de polpa de maracujá e em mousse sem adição de polpa. O produto Simbioflora® foi adicionado à preparação, e durante os 21 dias de estocagem refrigerada, com análises realizadas a cada 7 dias, avaliou-se a viabilidade dos micro-organismos, a determinação do pH e análise de contaminantes nas amostras. O estudo foi realizado em duplicata. Com os resultados, pode-se afirmar que a mousse de maracujá é uma viável alternativa para carrear micro-organismos probióticos, devido à quantidade de UFC/g das amostras ter se mantido viável durante a estocagem, mostrando que a acidez do maracujá não interferiu na sobrevivência de uma quantidade adequada de micro-organismos probióticos. Coliformes totais e *E. coli* mostraram-se ausentes na mousse de maracujá. Portanto, a mousse de maracujá apresenta-se como boa carreadora de probióticos, aumentando assim as possibilidades de alimentos capazes de manter a viabilidade destes micro-organismos até o momento de seu consumo.

PALAVRAS-CHAVE: probióticos, alimentos probióticos, mousse probiótica.

ABSTRACT

SURVIVAL OF PROBIOTIC MICRO-ORGANISM IN PASSION FRUIT MOUSSE

The increasing interest in probiotics by the population has shown to be more and more expressive, as well as the amount of studies that investigate the mechanisms of action of such bacteria. The lyophilized probiotic microorganisms present as an alternative of consumption that can be explored by different researches in different foods. The objective of the present work was the development of symbiotic passion fruit mousse, where the survival of these microorganisms in this product during the storage period under refrigeration conditions was evaluated, identifying if this is a good vehicle for these microorganisms. The analysis was performed in mousse with passion fruit pulp and in mousse without addition of pulp. The Simbioflora® product was added to the preparation and, during the 21 days of refrigerated storage, with analyzes performed every 7 days, the viability of the microorganisms, pH determination and analysis of contaminants in the samples were evaluated. The study was performed in duplicate. With the results, it can be stated that passion fruit mousse is a viable alternative to carry probiotic microorganisms, because the amount of CFU/g of the samples remained viable during storage, showing that the passion fruit acidity did not interfere in the Survival of an adequate amount of probiotic microorganisms. Total coliforms and *E. coli* were absent in passion fruit mousse. Therefore, passion fruit mousse presents itself as a good carrier of probiotics, thus increasing the possibilities of foods capable of maintaining the viability of these microorganisms until the moment of their consumption.

KEYWORDS: probiotics, probiotic foods, probiotic mousse.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Formulação das Mousses de maracujá e mousse sem adição de polpa.....	13
Tabela 2.	Sobrevivência de micro-organismos probióticos em mousse com e sem adição de polpa de maracujá.....	15
Tabela 3.	O valor de pH de mousse com adição de polpa de maracujá e sem adição da polpa.....	18
Tabela 4.	Análise de contaminantes de Levedura e Coliformes Totais no 21º dia de estocagem na mousse com adição de polpa de maracujá e na mousse sem adição da polpa.....	20

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	4
1.1.1. Objetivo Geral	4
1.1.2. Objetivos Específicos	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
3. METODOLOGIA	12
3.1. Produção de Mousse	12
3.2. Análise Microbiológica	13
3.2.1. Determinação da sobrevivência do probiótico	13
3.2.2. Análise de coliformes totais	14
3.2.3. Análise de mofos e leveduras	14
3.3. Determinação do pH	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Sobrevivência de probiótico em mousse	15
4.2. Valor do pH da mousse probiótica ao longo do período de estocagem.	18
4.3. Análise de leveduras e coliformes totais em mousse probiótica.	19
5. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

Definidos pela FAO/WHO (2001) como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, os probióticos têm ganhado cada vez mais destaque.

Nos últimos tempos, mudanças em diversas áreas do cenário mundial vêm causando relevantes impactos na população. A qualidade de vida dos indivíduos tem sido influenciada por tais mudanças, onde, como resultado, torna-se possível citar o aumento da expectativa de vida humana. Tem-se avaliado cada vez mais a microbiota intestinal do hospedeiro e sua relação com o bom funcionamento de seu organismo (SAAD, 2006).

Com o crescente reconhecimento da importância de se ter uma alimentação saudável, o número de pessoas interessadas nesses alimentos impulsionou a indústria para que o desenvolvimento de produtos que atinjam as expectativas do público em questão seja suprido, de modo a estimular o campo científico a desenvolver tais alimentos (SAARELA et al, 2000).

Dentre os estudos já realizados acerca do assunto, pode-se observar que a influência da ação de probióticos e de prebióticos no organismo tem se mostrado importante, ao passo que tem-se esclarecido sua relação com a obtenção de uma microbiota intestinal saudável para o hospedeiro (SAAD, 2006).

Dada as características de ação de micro-organismos probióticos e de alimentos prebióticos, a incorporação de uma formulação que una ambos - chamada simbióticos - tem sido vista como uma viável alternativa de implementação de probióticos em alimentos. Pode-se considerar que a sobrevivência do probiótico no colón possa ser beneficiada pela presença de prebióticos, possibilitando mais chances de que os benefícios advindos do

consumo destas bactérias ocorram. Os simbióticos estão aumentando seu espaço e relevância no campo das pesquisas alimentares (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Acredita-se que ser apto a colonizar o epitélio do trato gastrointestinal do hospedeiro, ser resistente ao pH mais baixo apresentado pelo estômago, não ser micro-organismo patogênico e sobreviver a tempo de armazenamento longo sejam algumas das características que micro-organismos probióticos devem apresentar para serem considerados tecnologicamente bons (KALANTZOPOULOS, 1997).

Para que seja considerada a possibilidade de efeitos benéficos para os indivíduos que consomem o produto que contenha micro-organismos probióticos, deve-se dar atenção ao fato de que tais micro-organismos estejam em quantidade adequada para que a ação benéfica destas bactérias seja viável. Desta maneira, no processo de inoculação das estirpes probióticas em determinado alimento, deve-se buscar – e avaliar – se a quantidade de micro-organismos no alimento é a adequada, tanto no momento da inoculação, quanto durante a vida de prateleira de tal produto (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Acredita-se que o desenvolvimento de estirpes probióticas mais resistentes pode ser, no futuro, um resultado da ação de, também, tecnologias genéticas (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Caso haja uma modificação genética nas estirpes probióticas na busca por melhoras significativas nas mesmas, deve-se ter cuidado para que não haja prejuízos na segurança de tais micro-organismos (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Com o passar do tempo, cada vez mais estudos estão sendo realizados na busca por resultados mais precisos sobre os meios mais adequados e viáveis de carrear micro-organismos probióticos, assim como a investigação da forma de ação dessas bactérias (OLIVEIRA et al, 2002).

Na busca por alimentos que melhor serviriam como veículos para incorporação de probióticos, é possível citar pesquisas com produtos lácteos e não-lácteos e fermentados e não-fermentados, por exemplo. Produtos derivados de laticínios podem ser bem vistos nesse aspecto, por apresentarem efeito protetor e também tamponante (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

É importante que durante as etapas de processamento e armazenamento as bactérias probióticas se mantenham viáveis e funcionalmente adequadas para cada produto. Devido a necessidade destes micro-organismos manterem-se adequados, a quantidade de estudos que englobam estes e outros aspectos tem aumentado gradualmente, onde, alguns até incluem análise sensorial dos produtos probióticos desenvolvidos, buscando avaliar se os mesmos apresentam uma boa aceitação nesse quesito (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

De acordo com pesquisas na área, os tópicos de funcionalidade e viabilidade de alimentos carreadores de probióticos e sua aceitabilidade pelos que os consomem estão acarretando, no geral, em resultados positivos (OLIVEIRA et al, 2002).

O desenvolvimento de alimentos probióticos tem sido alvo de estudo de vários pesquisadores da área de alimentos. Um dos maiores problemas dos alimentos funcionais probióticos é a perda da viabilidade ao longo do período de estocagem, principalmente os alimentos em estocagem refrigerada e sob congelamento. Atualmente tem crescido o mercado de “suplementos” probióticos na forma desidratada. A recomendação do fabricante desse tipo de produto é a reidratação do produto em água. Entretanto, o uso de suplemento em preparações como mousse de maracujá ainda não foi avaliado quanto a viabilidade do micro-organismo no momento da adição à mousse, e também durante um período determinado de estocagem refrigerada. Assim, o presente estudo tem como

objetivo desenvolver uma mousse de maracujá simbiótica, e também acompanhar a sobrevivência de micro-organismos probióticos ao longo do período de estocagem refrigerada.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de mousse de maracujá probiótica.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Elaboração da mousse de maracujá probiótica;
- Analisar a sobrevivência dos micro-organismos probióticos ao longo do período de estocagem em condições de refrigeração;
- Determinar o pH ao longo do período de estocagem.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Na busca por melhores condições de saúde para a população que, cada vez mais vêm sendo acometida por doenças, pesquisas tem sido realizadas na tentativa de que, através da alimentação, haja um reforço no combate de enfermidades, assim, infere-se que alimentos funcionais vêm aumentando seu espaço no cenário mundial. Nesse contexto, pode-se definir probióticos, do grego “Probios” - na tradução “para a vida” -, como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (MORAES & COLLA, 2006; GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999; FAO/WHO, 2001).

Bactérias que fazem parte dos gêneros *Lactobacillus* (a exemplo de *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*) e *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis*, por exemplo) apresentam um grande número de espécies com propriedades probióticas, onde, no geral, os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* predominam na flora intestinal de um adulto com a saúde adequada, sendo capazes de colonizar o intestino com mais facilidade (COLLINS et al., 1998; HOLZAPFEL et al., 1998; SAAD, 2006; KALANTZOPOULOS, 1997).

É possível afirmar que *L. acidophilus*, do grupo dos *Lactobacillus*, apresenta, no geral, uma boa sobrevivência à passagem pelo trânsito gastrointestinal. Uma das características do *L. acidophilus* – bacilo gram-positivo com pontas arredondadas, podendo encontrar-se na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas – é ser microaerofílico e pouco tolerante à salinidade do meio, além de poder fermentar diversos tipos de açúcares. Acrescenta-se, ainda, que pH de 5.5–6.0 e temperaturas de 35-40°C são valores compreendidos como condições ótimas para a multiplicação eficaz de *L. acidophilus*. Há um cuidado para que não haja alteração sensorial advinda da incorporação

de probióticos a um alimento e/ou produto (KALANTZOPOULOS, 1997; GOMES & MALCATA, 1999; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Além dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, há outras bactérias probióticas que podem, ou não, ser produtoras de ácido láctico, sendo as não lácticas mais utilizadas na alimentação animal e/ou pela indústria farmacêutica. Também podem ser utilizadas como probióticos algumas espécies de *Bacillus* e *E. coli* e algumas estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; WGO, 2011).

Dependendo da estirpe probiótica utilizada, e também do tipo de tecnologia empregada no desenvolvimento de um alimento probiótico, a estabilidade do micro-organismo ao longo do período de estocagem poderá ser comprometida. Considerando a importância de uma seleção apropriada de micro-organismos probióticos a ser utilizados, deve-se dar atenção àqueles que melhor suportariam os processos de preparo e armazenamento de seus produtos, de modo a resistir posteriormente à passagem pelo trato gastro-intestinal do hospedeiro (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004; VENTURA & PEROZZI, 2011; TRIPATHI & GIRI, 2014).

A recomendação de probióticos, que antes era embasada na quantidade viável de 10^6 UFC por grama ou ml para um alimento ser considerado probiótico, é agora estabelecida no sentido de que os benefícios sejam alcançados pelos indivíduos que consomem o alimento probiótico, portanto, recomenda-se, ao menos, a ingestão de alimento contendo de 10^8 a 10^9 UFC por dia (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; BRASIL, 2008).

Vários alimentos podem ser utilizados para carrear micro-organismos probióticos, entretanto são os produtos lácteos como diversos tipos de queijos, leites fermentados, iogurte, entre outros que são mais utilizados, além do fato dos mesmos apresentarem, em

geral, uma boa aceitabilidade (MATTILA-SANDHOLM et al, 2002; OLIVEIRA et al, 2002).

Durante o armazenamento de produtos probióticos, há fatores que afetam a sobrevivência destes micro-organismos, a exemplo do teor do oxigênio, exposição à luz, umidade relativa do ar, temperatura e alguns outros advindos do ambiente de armazenamento, além de demais fatores, como o tipo de material que compõe a embalagem do produto e a composição do alimento em si. Alguns aditivos utilizados em produtos probióticos podem também alterar a viabilidade e o crescimento de bactérias probióticas (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; VINDEROLA et al., 2002).

É de suma relevância que os micro-organismos probióticos sobrevivam desde sua introdução em produtos probióticos até chegar às mãos do indivíduo que irá consumi-los, e, visto que a viabilidade de tais micro-organismos está diretamente relacionada com a qualidade do produto probiótico, houve um crescente aumento em pesquisas que procuram novas formas de proteger os probióticos e garantir sua funcionalidade após as etapas de preparo e armazenamento, visando garantir, e até aumentar a vida de prateleira de produtos probióticos (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Há algumas técnicas utilizadas que visam ampliar a vida de prateleira de produtos probióticos, e entre as quais encontra-se a secagem - seus métodos mais comuns em produtos alimentares são pulverização, sob vácuo, com ar quente, por congelamento - , porém, apesar dos benefícios de tal técnica, a mesma pode causar perda da viabilidade dos probióticos, logo, sugere-se que, não preso a uma só estirpe, há a necessidade de melhorar os parâmetros do processo de secagem. Para o processo de secagem descobriu-se que há substâncias - a exemplo de leite em pó desnatado e glicerol - que, quando adicionadas, podem atuar como protetores celulares para probióticos (TRIPATHI & GIRI, 2014; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2006; HUBALEK, 2003).

A composição do meio de crescimento é um dos fatores que pode influenciar a taxa de sobrevivência de probióticos, e estudos indicam que, quando cultivados na presença de determinados tipos de açúcares, alguns probióticos podem ser protegidos de alguma forma, visto que há pesquisas que afirmam que, durante o armazenamento, a membrana da célula dos probióticos pode ser estabilizada devido à presença de dissacarídeos (TRIPATHI & GIRI, 2014; CARVALHO et al., 2002).

Diversas pesquisas demonstram os benefícios da técnica de micro-encapsulação, e que a mesma pode estabilizar as características sensoriais. A micro-encapsulação - tecnologia que permite proporcionar um resguardo das células probióticas no produto que recebe tais cepas, inclusive no momento de sua passagem pelo trato gastrointestinal do indivíduo que o consome, visto que ocorre, no sítio de ação pretendido, a soltura do probiótico - pode aumentar a viabilidade de células probióticas durante armazenamento refrigerado de leites fermentados (GOMES & MALCATA, 1999; SIMEONI et al, 2014; TRIPATHI & GIRI, 2014).

Apesar da técnica de microencapsulação ter sido apontada como uma viável alternativa de proteção dos micro-organismos probióticos, principalmente ao ter contato com o trato gastrointestinal, há estudos que indicam que a técnica de imobilização pode não ser eficiente dependendo do alimento e das substâncias protetoras utilizadas (ROSS et al., 2005; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Acredita-se que, apesar de micro-organismos probióticos poderem sobreviver por mais tempo quando congelados, ao mesmo tempo, o processo de congelamento pode ser considerado um risco para a integridade de tais micro-organismos, pois, durante o congelamento, as membranas das células dos probióticos podem ser prejudicadas. Seu descongelamento também pode representar um risco, em parte, por alterações metabólicas,

interferência em seu desenvolvimento, entre outros (AKIN; AKIN; KIRMACI, 2007; ALAMPRESE et al., 2002).

A busca por novas maneiras de aumentar a vida de prateleira dos produtos probióticos tem atraído cada vez mais pesquisas acerca do assunto, ao passo que a investigação dos fatores que afetam sua viabilidade durante seu processamento e armazenamento tem mostrado-se cada vez mais promissora, tanto no âmbito industrial quanto científico (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Além dos micro-organismos probióticos, os prebióticos também são utilizados como ingredientes em vários tipos de alimentos de modo a proporcionar benefícios à saúde do indivíduo que o consome (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Podendo ser encontrados, por exemplo, em beterraba, mamão, alho, cebola, tomate e chicória, entre outros, os prebióticos podem ser definidos por serem os principais substratos de crescimento dos micro-organismos dos intestinos, e, apesar de não serem digeridos no intestino delgado, estes ingredientes alimentares são metabolizados ao chegarem ao intestino grosso, e tal metabolização é realizada de forma seletiva por bactérias benéficas em número limitado. Dessa maneira, uma microbiota bacteriana saudável será proporcionada pela alteração da microbiota do cólon (PASSOS & PARK, 2003; RAIZEL et al., 2011).

Acredita-se que o uso de prebióticos pode resultar em efeitos fisiológicos que são importantes para a saúde dos indivíduos, ao passo que o mesmo pode estimular o crescimento e metabolismo de uma microbiota bacteriana saudável devido ao aumento das bactérias benéficas, em especial *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (RAIZEL et al., 2011; CUPPARI, 2005; KARKOW; FAINTUCH; KARKOW, 2007).

Prebióticos podem ser fermentáveis ou não fermentáveis, dividindo-se em insolúveis, solúveis ou mistos. Intitulados como frutanos, a inulina e o

frutooligossacarídeos (FOS) - fibras estas fermentáveis e solúveis -, são considerados como as fibras de maior relevância que são utilizadas como prebióticos. Estudos indicam que essas fibras em questão podem produzir um efeito bifidogênico, resultado de um processo de fermentação diferenciado, o que contribui para diversos benefícios à saúde. A fermentação pode levar à produção de ácido lático, havendo assim estímulo à proliferação de células epiteliais do cólon e à redução do pH do lúmen (CARABIN & FLAMM, 1999).

Acredita-se que entre 18 a 20g/dia seja a quantidade considerada adequada para que haja efeito benéfico dos prebióticos, não ultrapassando tais valores, a fim de evitar desconfortos intestinais. Seus efeitos estão relacionados com o quanto que a microbiota intestinal pode realizar a fermentação dos carboidratos (RAIZEL et al., 2011; CUPPARI, 2005).

Ressalta-se o gradativo empenho pela aprimoração de simbióticos, pois estudos indicam que a utilização de probióticos e prebióticos, quando juntos, possam trazer melhores resultados para a saúde do hospedeiro (TRIPATHI & GIRI, 2014).

De acordo com a Resolução N° 19, De 30 De Abril De 1999 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), uma Comissão de Assessoramento Técnico-Científica em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos – constituída pela própria ANVISA – é responsável por ponderar, através de uma avaliação técnica, se os alimentos e/ou produtos alimentícios que desejam ser classificados como funcionais podem assim ser. Infere-se que seu uso baseia-se, de acordo com a FDA (Food and Drug Administration), na pretensão do produto e em seus objetivos ao ingeri-lo (BRASIL, 1999b; MORAES & COLLA, 2006).

Determinados carotenóides, vitaminas, fibras, ácidos graxos ômega 3, assim como os probióticos são alguns dos componentes bioativos que podem estar presentes em alimentos funcionais (MORAES & COLLA, 2006).

Torna-se importante destacar que a rotulagem de produtos que alegam ser funcionais deve obedecer aos critérios estabelecidos pela ANVISA, onde, em sua Resolução Nº 18, De 30 De Abril De 1999, estabelece-se que na rotulagem só devem conter informações sobre o que pode ser demonstrado - os nutrientes que já tem reconhecimento pleno de suas funções pela comunidade científica não há necessidade, na rotulagem, de demonstração de eficácia (BRASIL, 1999a).

A Resolução Nº 18, De 30 De Abril De 1999 da ANVISA também estabelece que na rotulagem de produtos funcionais não deve-se afirmar seu uso para cura de doenças, contudo, é permitido, entre outros aspectos, citar seu benefício para a manutenção da saúde em geral, por exemplo (BRASIL, 1999a).

3. METODOLOGIA

3.1. Produção de Mousse

Para a elaboração da mousse de maracujá utilizou-se os seguintes ingredientes: açúcar refinado (União Premium), creme de leite UHT Homogeneizado (Italac), gelatina em pó sem sabor (Royal), leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), leite UHT desnatado (Italac), polpa de maracujá (Brasfrut) e Simbioflora® (Invictus) (produto formulado com *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis* e frutooligossacarídeos). Realizou-se também o preparo de mousse sem sabor, indicado como mousse sem adição de polpa, a fim de avaliar a interferência, ou não, da polpa de maracujá no resultado final do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g das amostras. Para isso, na mousse sem adição de polpa, não adicionou-se a polpa de maracujá na preparação, mantendo-se os demais ingredientes e etapas de preparação das amostras iguais ao da mousse de maracujá.

A formulação da mousse de maracujá e da mousse sem adição de polpa encontra-se na Tabela 1. Os ingredientes utilizados em cada mousse foram pesados, e, em seguida, homogeneizados em um recipiente e, posteriormente, aquecidos a 60°C por aproximadamente 5 min. Aguardou-se que as misturas resfriassem, e em seguida bateu-se na batedeira por aproximadamente 1 min cada mousse. Em seguida, porções estabelecidas da mousse (30g) foram distribuídas em recipientes plásticos apropriados. Os sachês contendo os probióticos e prebiótico foram adicionados após a distribuição das mousses nos recipientes (3g do sachê por recipiente). Após esse preparo, estocou-se as amostras na geladeira e a viabilidade do micro-organismo probiótico foi determinada com 7, 14 e 21 dias de estocagem. O experimento foi realizado em duplicata.

Tabela 1. Formulação das Mousses de maracujá e mousse sem adição de polpa.

Ingredientes	Com polpa de Maracujá (100g)	Sem adição de polpa (100g)
Açúcar Refinado	10%	10%
Creme de Leite	19,2%	19,2%
Gelatina em Pó sem Sabor	1,2%	1,2%
Leite em Pó Desnatado	4%	4%
Leite UHT Desnatado	50%	65%
Polpa de Maracujá	15%	0
Simbioflora® (Invictus)		

3.2 Análise Microbiológica

3.2.1. Determinação da sobrevivência do probiótico

Para a análise microbiológica utilizou-se 25g de cada uma das amostras de mousse (com adição de polpa de maracujá e sem adição de polpa), homogeneizadas com 225mL de salina 0,85% para cada amostra. Essas foram submetidas a diversas diluições seriadas (10^{-7}) em frascos contendo 9mL de solução salina 0,85%. Após diluição, as diluições selecionadas foram plaqueadas (em placas contendo meio de cultura agar MRS), utilizando-se a técnica de plaqueamento “*Spread Plate*”. Incubou-se as placas em estufa a

37°C por 48h. Após esse período de incubação as placas que apresentaram colônias na faixa de 25 a 250 colônias foram selecionadas para a determinação do número de UFC.

3.2.2. Análise de coliformes totais

A análise de coliformes totais foi realizada seguindo orientações do Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (SILVA et al, 2010).

Para a análise dos coliformes totais, selecionou-se as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} das amostras de mousse com adição de polpa de maracujá e mousse sem adição de polpa, para então serem analisadas. Em seguida, foi inoculado LST (Caldo Lauril Sulfato Triptose) em tubos com 10ml de LST cada, onde cada diluição analisada teve 3 tubos (1mL de cada diluição adicionada a cada tubo com 10mL de LST). Após a inoculação das diluições das amostras em LST, os tubos de LST foram incubados a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}/24 \pm 2\text{h}$. Foi observado, então, se havia crescimento com produção de gás. Realizou-se a contagem de quantos tubos de LST apresentaram crescimento com produção de gás e quantos não apresentaram. A partir da quantidade estabelecida de tubos com e sem produção de gás, foi determinado o NMP (Número Mais Provável)/g de produto tanto nas amostras da mousse com adição de polpa de maracujá, quanto nas de mousse sem adição de polpa.

3.2.3. Análise de mofos e leveduras

A análise de mofos e leveduras foi realizada a partir da técnica de lamino cultivo, segundo as recomendações do fabricante (NUTRILAB, Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda).

3.3. Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado utilizando fitas indicadoras de pH (*pH-Fix test strips MACHEREY-NAGEL*), também medido em tempo estabelecido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sobrevivência de probiótico em mousse

A sobrevivência do micro-organismo probiótico em mousse elaborada com e sem adição de polpa de maracujá foi avaliada (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência de micro-organismos probióticos em mousse com e sem adição de polpa de maracujá.

Tempo (dias)	Com adição de polpa (UFC g ⁻¹)	Sem polpa (UFC g ⁻¹)
0 dias	3,05 x 10 ⁷ UFC/g	3,75 x 10 ⁷ UFC/g
7 dias	3,37 x 10 ⁶ UFC/g estimado	5,27x 10 ⁶ UFC/g estimado
14 dias	2,58 x 10 ⁸ UFC/g estimado	7,08x10 ⁷ UFC/g estimado
21 dias	Presença de fungos e leveduras	Presença de fungos e leveduras

Comparando-se as Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) em diferentes tempos das amostras da mousse com adição de polpa de maracujá e sem adição da polpa à medida que o período de estocagem aumenta, torna-se perceptível que, de maneira geral, houve aumento da população de probióticos no decorrer do período de estocagem. Na análise realizada no dia da preparação das amostras, observou-se um crescimento dos micro-organismos probióticos em agar MRS tanto na mousse com adição de polpa de maracujá, quanto na mousse sem adição da polpa. De certa maneira, já era esperado que houvesse crescimento no dia da preparação.

Até o 7º dia de estocagem, as preparações da mousse com polpa de maracujá e mousse sem polpa, apresentaram a contagem de UFC's com resultados basicamente na mesma faixa com relação à população microbiana. Durante o período de estocagem, observou-se uma redução, quando na mesma amostra de mousse, em relação ao primeiro dia de estocagem. Logo, pode-se constatar que o tempo de estocagem acabou influenciando. A condição de estocagem refrigerada pode ter proporcionado essa redução. Como a mousse foi elaborada com a adição do micro-organismo probiótico na forma liofilizada, provavelmente o produto já continha uma grande parcela da população microbiana injuriada. E com isso, aumentou a sensibilidade do micro-organismo à temperatura de refrigeração, que provavelmente pode ter contribuído com a perda de viabilidade durante o período de estocagem.

Contudo, com 14 dias de estocagem, observou-se um aumento da sobrevivência da cultura probiótica na mousse com e sem adição de polpa de maracujá. Este aumento da sobrevivência do micro-organismo probiótico pode estar relacionado a inúmeros fatores. A ocorrência de erro experimental é uns dos fatores que pode ter contribuído para essa variação de resultados. Além disso, por se tratar de um produto elaborado com creme de leite, o alto teor de gordura pode ter dificultado a homogeneização do produto de forma adequada, e com isso pode ter contribuído para formação de grumos com alta população microbiana. Assim, não pode-se afirmar se o micro-organismo cresceu na mousse durante o período de estocagem de 14 dias.

A perda de viabilidade do micro-organismo probiótico durante a estocagem refrigerada é comum de ocorrer em alimentos. Deste modo, a perda de viabilidade do micro-organismo probiótico em mousse durante o período de estocagem já era esperado. É importante ressaltar que a redução da sobrevivência do micro-organismo probiótico em mousse não desqualifica o produto como alimento com alegação de propriedade funcional.

O número de micro-organismos viáveis encontra-se dentro da faixa de recomendação, necessária para proporcionar benefícios à saúde do consumidor.

Com 21 dias de estocagem observou-se, além do crescimento do micro-organismo probiótico em meio de cultura agar MRS, o crescimento de fungos e leveduras. Neste mesmo período de estocagem, a população microbiana de probióticos se manteve em número suficiente para que a mousse seja considerada um alimento com alegação de propriedade funcional. O crescimento do fungo na placa contendo agar MRS dificultou a contagem do micro-organismo probiótico, mas visivelmente percebe-se um bom crescimento do micro-organismo probiótico. Assim, observa-se que a mousse probiótica não pode ser consumida devido à presença do crescimento de micro-organismos deterioradores como fungos e leveduras. Produtos preparados em ambientes domésticos sem uso de conservantes e estocados sob refrigeração, normalmente apresentam uma vida útil de 5 dias de estocagem.

Assim constata-se que o produto liofilizado Simbioflora® apresenta potencial para ser adicionado em preparação de mousse de maracujá. A adição de polpa de maracujá, apesar de sua acidez, não afetou a sobrevivência do micro-organismo probiótico.

Resultados semelhantes foram encontrados por Leal et al (2009), onde, em seu trabalho, publicou um estudo com mousse de manga, elaborada com a adição de diferentes hidrocolóides (goma xantana, goma lacusta e uma amostra com a junção de ambas), e contou com a incorporação de *Lactobacillus Paracasei* na composição da mousse. Os autores encontraram que, durante os 21 dias de armazenamento sob refrigeração, a viabilidade dos micro-organismos probióticos na mousse de manga não foi afetada, permanecendo dentro da faixa para ser considerada viável.

Coman et al (2012) realizou estudos a fim de testar a possibilidade de que novos

alimentos lácteos e não lácteos poderiam carrear combinações de bactérias probióticas, e, para isso, micro-organismos probióticos foram inoculados na forma liofilizada (com o produto SYN BIO®) em diferentes alimentos, entre eles mousse de chocolate. Diante do fato de a contagem microbiana neste produto ter sido atestada pelos autores como viável, pode-se ressaltar que a quantidade de alimentos considerados aptos para carrear micro-organismos probióticos é cada vez mais ampla, ao passo que alimentos como mousses estão tendo aumento gradual de estudos investigando sua capacidade de serem veículos para bactérias probióticas.

4.2. Valor do pH da mousse probiótica ao longo do período de estocagem.

O pH da mousse com adição de polpa de maracujá e da mousse sem adição de polpa foram determinados (Tabela 3).

Tabela 3. O valor de pH de mousse com adição de polpa de maracujá e sem adição da polpa.

Tempo (dias)	Com polpa (pH)	Sem polpa (pH)
0 dias	4,5	7,0
7 dias	4,6	6,0
14 dias	4,0	6,0
21 dias	5,0	5,5

Após análise dos valores de pH da mousse com adição de polpa de maracujá e sem adição da polpa em diferentes períodos de estocagem, torna-se possível sugerir que as alterações nos valores de pH das amostras da mousse com adição de polpa de maracujá podem ser resultantes do metabolismo do micro-organismo. O valor de pH das amostras

foi determinado com fita indicadora de pH, e por ser um método pouco preciso provavelmente pode ter também contribuído nesta variação de pH observada nas duas preparações. Com 21 dias de estocagem observou-se um aumento no valor de pH da mousse com polpa de maracujá. Este aumento pode estar relacionado ao metabolismo de compostos ácidos por fungos, resultando na formação de compostos que levam ao aumento do pH do produto. Além disso, este aumento de pH pode estar associado com a variação da técnica de determinação de pH que é considerada pouco precisa.

O decréscimo no valor de pH na mousse sem adição de polpa de maracujá já era esperado. O pH 7 apresentado pela mousse sem adição de polpa de maracujá logo após o preparo é uma condição propícia para o crescimento da maioria dos micro-organismos. Assim, nesta condição espera-se que os micro-organismos probióticos e também os contaminantes tenham um metabolismo mais acelerado, o que provavelmente pode ter resultado no decréscimo do pH da amostra de mousse sem adição de polpa.

Aragon-Alegro et al (2007), em seu trabalho acerca de mousse de chocolate probiótica e simbiótica, também encontrou redução do pH durante o armazenamento, no caso, de 28 dias de suas amostras. Em sua pesquisa, os autores trabalharam com amostras probióticas, simbióticas e também com amostras sem adição de probióticos, e observou-se que a adição de probiótico e prebiótico à mousse de chocolate não interferiu na viabilidade do produto.

4.3. Análise de leveduras e coliformes totais em mousse probiótica.

A presença de leveduras foi constatada na amostra de mousse de maracujá e também em mousse sem adição de polpa de maracujá (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de contaminantes de Levedura e Coliformes Totais no 21º dia de estocagem na mousse com adição de polpa de maracujá e na mousse sem adição da polpa.

Análise	Com adição de polpa	Sem adição de polpa
Levedura	10^5 UFC/g	10^5 UFC/g
Coliformes Totais	< 3,0 NMP/g	>1.100 NMP/g

A presença de leveduras foi detectada no 21º dia de estocagem nas duas formulações de mousse, e em ambas foi observado o mesmo resultado quanto à quantificação de leveduras.

A análise de coliformes totais também foi utilizada para avaliar a presença de contaminantes no 21 º dia de estocagem (Tabela 4). Em mousse de maracujá não foi detectada a presença de coliformes totais, mas na mousse sem adição de polpa de maracujá foi detectado um número elevadíssimo de coliformes totais.

A presença de coliformes totais revelou o quanto a mousse sem adição da polpa mostrou-se contaminada em seu 21º dia de estocagem. O maracujá é uma fruta muito ácida, e com isso o pH da mousse de maracujá após o preparo apresentou-se baixo (pH 4,5). A acidez da mousse pode ter contribuído para a inibição de micro-organismos pertencentes ao grupo dos coliformes totais. A acidez de um alimento é uma característica intrínseca do alimento que inibe o crescimento dos micro-organismos devido à acidificação do citoplasma da célula. Quando ocorre esta acidificação, o micro-organismo perde a viabilidade, e conseqüentemente a sua atividade metabólica. Alguns micro-organismos apresentam mecanismos de resistência para combater esta acidificação citoplasmática, mas o número de micro-organismos que não apresentam este mecanismo é muito grande. Tal

fato pode justificar o porquê de não ter havido o crescimento de coliformes totais na amostra da mousse com adição de polpa de maracujá.

Ressalta-se que este resultado foi muito interessante, pois o alimento ácido acabou protegendo os micro-organismos probióticos, pois o crescimento de coliformes totais se deu principalmente na mousse sem adição da polpa, e isso foi importante. Destaca-se, ainda, que este é um resultado muito relevante, pois acaba contribuindo para um controle do crescimento de micro-organismos indesejáveis. Entretanto, pode-se considerar que a mousse, em si, é um alimento que pode incorporar o micro-organismo probiótico sem afetar sua viabilidade.

Um estudo com mousse de chocolate realizado por Aragon-Alegro et al (2007) também não constatou a presença de Coliformes totais e/ou *E. Coli* durante o tempo de armazenamento desta mousse de chocolate em nenhuma de suas 3 repetições das 3 diferentes amostras avaliadas por ele.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados da análise da sobrevivência de micro-organismos probióticos após sua inoculação em mousse de maracujá, torna-se possível concluir que este produto é um excelente veículo para micro-organismos probióticos. A acidez do maracujá não interferiu na sobrevivência dos micro-organismos probióticos, mantendo o produto com uma população de micro-organismos probióticos, até os 21 dias de estocagem refrigerada, em conformidade com o estabelecido para alimentos probióticos. Apesar da variação de pH apresentada pela mousse com adição de polpa de maracujá, seu valor de pH ainda é considerado propício para tal alimento.

Considerando que o crescimento de fungos e leveduras deu-se somente no 21º dia de estocagem sob refrigeração, torna-se possível afirmar que tal fato ocorreu devido à vida útil da própria mousse, já que, por ser uma preparação caseira, refrigerada e sem adição de conservantes, tem sua vida útil em torno de 5 dias.

A ausência de coliformes totais e *E. coli* na mousse com adição de polpa de maracujá sugere que a acidez natural do maracujá pode ter impedido o crescimento de tais micro-organismos contaminantes. Este resultado mostrou-se interessante, de modo a contribuir para um melhor controle do crescimento de micro-organismos indesejáveis.

Ressalta-se que o resultado obtido a partir desta análise mostrou-se muito relevante, pois reforça a variedade de alimentos que podem carrear micro-organismos probióticos sem afetar sua viabilidade. Sobremesas tem ganhado cada vez mais espaço entre os alimentos estudados, e as mousses vêm se destacando, sendo alvo de pesquisas acerca de sua capacidade de incorporar bactérias probióticas. Com os resultados obtidos neste estudo, considera-se que o Simbioflora® apresenta potencial para ser adicionado à mousse de maracujá e permanecer viável. Logo, a mousse de maracujá simbiótica pode ser incluída

no grupo de produtos alimentares a ser utilizado pela população em prol dos benefícios que os micro-organismos probióticos podem proporcionar.

É possível completar, ainda, que o nutricionista tem uma importante relação com os micro-organismos probióticos. Devido aos benefícios à saúde do hospedeiro ligados ao consumo de uma quantidade adequada de probióticos, o conhecimento acerca desta ação tem sido constantemente elucidado. Com isso, pode-se inferir que a imagem destas bactérias frente a pesquisadores e consumidores tem se tornado cada vez melhor. Como o nutricionista faz parte dos profissionais que atuam como promotores da saúde, cabe ressaltar que o aumento da oferta e variedade de alimentos carreadores de micro-organismos probióticos também pode aumentar a variedade de ferramentas de conduta dietética – quando conveniente à uma situação ou paciente em que seja julgada adequada a recomendação - disponibilizadas a este profissional. Tal fato, se utilizado adequadamente, pode contribuir para o aumento do reconhecimento das bactérias probióticas e, por conseguinte, o aumento da promoção à saúde.

Por fim, é possível destacar o fato de que o gradual aumento de pesquisas acerca de possíveis carreadores eficientes para bactérias probióticas tem proporcionado aos indivíduos uma maior gama de escolhas de alimentos que confirmam benefícios à saúde. Desta maneira, os comensais interessados em ingerir produtos probióticos não ficarão limitados a poucas formas de consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic icecream. **Food Chemistry**, vol.104, p. 93–99, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/222690410_Effects_of_inulin_and_sugar_levels_on_the_viability_of_yogurt_and_probiotic_bacteria_and_the_physical_and_sensory_characteristics_in_ice_cream>. Acesso em: 10 abr. 2016.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **Int. Dairy J.**, vol.12, p.201-208, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694601001595>>. Acesso em: 14 Jun. 2016.

ARAGON-ALEGRO L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. **LWT Food Science and Technology**, vol.40, p. 669-675, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380600051X>>. Acesso em: 02 nov. 2016

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 08 abr. 2016

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, DE 30 DE ABRIL DE 1999 - Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasil, 03 maio 1999a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RESOLUCAO_18_1999.pdf/0e770367-b484-4193-a101-528415d38b12>. Acesso em: 08 abr. 2016

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Nº 19, DE 30 DE ABRIL DE 1999 – Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasil, 03 maio 1999b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RESOLUCAO_19_1999.pdf/f33ae19c-1f69-4994-8fb3-82fd5b8024b9>. Acesso em: 08 abr. 2016.

CARABIN I.G. & FLAMM W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regul Toxicol Pharmacol**, vol.30, p.268-82, 1999. Disponível

em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230099913491>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. **Biotechnology Letters**, vol.24, p.1587–1591, 2002. Disponível em: <<http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/5233/1/Survival%20of%20freezedried%20Lactobacillus%20plantarum%20and%20Lactobacillus.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

COLLINS, J. K.; THORTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selections of probiotic strain for human applications. **Int. Dairy Journal**, vol.8, p.487-490, 1998. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0958694698000739/1-s2.0-S0958694698000739-main.pdf?_tid=d7dc0842-aa64-11e6-978f-00000aab0f01&acdnat=1479126257_6c54765c36cf24b88445fd9630e0d2>. Acesso em 14 nov. 2016.

COMAN, M. M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M. C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International journal of food microbiology**, vol.157, p.346-352, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512002851>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

Comitê de Diretrizes Práticas. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos e prebióticos. 2011. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-portuguese-2011.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

CUPPARI L. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. Escola Paulista de Medicina. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2005.

DOWNES, F. P. & ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (4th ed.). Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial agents**, vol.12 p.287-292, 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/12805842_Review_of_probiotics_available_to_modify_intestinal_flora>. Acesso em: 10 abr. 2016.

GOMES, A. M. P. & MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, vol.10, p.139–157, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224499000333>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms 1'2'3. **The american journal of clinical nutrition**, vol.73, no.2, p.374S-379S, 2001. Disponível em <<http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/374s.long> > Acesso em: 13 nov. 2016.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; VELD, J. H. J. H. I. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of food microbiology**, vol.41, p.85-101, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160598000440>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

HOLZAPFEL, W. H. & SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, vol.35, p.109-116, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996901001715>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, vol.46, p.205–229, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224003000464>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**. vol.3, p. 185–190, 1997. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996497900998>> Acesso em: 13 nov. 2016.

KARKOW F.J.A.; FAINTUCH J.; KARKOW A.G.M. Probióticos: perspectivas médicas. **Rev AMRIGS**, vol.51, p.38- 48, 2007. Disponível em: <<http://www.amrigs.com.br/revista/51-01/aesp01.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol.44, no.3, p.329-347, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000300003>. Acesso em: 08 abr. 2016.

LEAL, C. L.; ARAGON, D. C.; COELHO, G. R.; DONATO, J. M.; SANTANA, E. H. W. de.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Potencial probiótico de mousse de manga elaborada com diferentes hidrocolóides. **Rev. Inst. Latic. “Candido Tostes”**, vol.64, no.371, p. 40-47, 2009. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/105/108>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

LOURENS-HATTINGH, A. & VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, vol.11, p.1-17, 2001. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095869460100036X>> Acesso em: 13 nov. 2016.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, vol.12, p.173– 182, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694601000991>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

MORAES, F. P. & COLLA, L. M. Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. **Revista Eletrônica De Farmácia**, vol.3, no.2, p.109-122, 2006. Disponível em: <<http://revistas.ufg.br/REF/article/view/2082/2024>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

OLIVEIRA M. N. de.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol.38 no.1, p.1-21, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 Jun. 2016.

PASSOS, L. M. L. & PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Vol.33, no.2, p.385-390, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v33n2/15236.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; FILHO, A. D. dos R.. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos. **Revista Ciência & Saúde**, vol.4, no.2, p.66-74, 2011. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/faenfi/article/viewFile/8352/7257>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **J. Appl. Microbiol.**, vol.98, p.1410-1417, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02654.x/full>>. Acesso em: 14 Jun. 2016.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol.42, no.1, p.1-16, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002> Acesso em: 13 nov 2016.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, vol.84, p.197-215, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816560003758>> Acesso em: 13 nov. 2016.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. **Letters in Applied Microbiology**, vol.42, p.271–276, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2005.01835.x/full>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. ITAL – Instituto de tecnologia de alimentos – Departamento de microbiologia. 2010.

SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. de A.; MENEZES, C. R. de.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação de probióticos: Inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, vol.18, p. 66-75. Ed. Especial Mai. 2014. Disponível em: <<http://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/13020/pdf>>. Acesso em: 12 Jun. 2016.

TALWALKAR, A. & KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Current Issues in Intestinal Microbiology**, vol.5, p.1–8, 2004. Disponível em: <<http://www.horizonpress.com/ciim/v/v5/01.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

TRIPATHI, M.K.& GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Elsevier: journal of functional foods**, vol.9, p.225-241, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001716>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

VENTURA, M. & PEROZZI, G. Probiotic bacteria and human gut microbiota. **Genes & Nutrition**, vol.6, p.203–204, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145059/>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, vol.12, p.579–589, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223067528_Influence_of_compounds_associated_with_fermented_dairy_products_on_the_growth_of_lactic_acid_starter_and_probiotic_bacteria>. Acesso em: 08 abr. 2016.