

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Alimentos

Viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis probióticas durante o armazenamento a 4 °C

Ana Lucia Orlandini Pilleggi de Sousa

Dissertação para a obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S725v Sousa, Ana Lucia Orlandini Pilleggi de
Viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis probióticas durante o armazenamento a 4°C / Ana Lucia Orlandini Pilleggi de Sousa. -- São Paulo, 2011. 68p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Oliveira, Maricê Nogueira de

1. Alimentos : Processamento : Tecnologia de alimentos 2. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 3. Nutrição : Infância : Ciência dos alimentos I. T. II. Oliveira, Maricê Nogueira de, orientador.

664 CDD

Ana Lucia Orlandini Pilleggi de Sousa

Viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis probióticas durante o armazenamento a 4 °C

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Maricê Nogueira de Oliveira

Orientadora / Presidente

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barreto Penna

1^o. examinador

Prof^a. Dr^a Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

2^o. examinador

São Paulo, 19 de Maio de 2011.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Maria Lucia e Paulo Sergio, pela formação do meu caráter, pelo apoio necessário, por me incentivarem a perseguir meus sonhos e batalhar pela concretização dos mesmos. Aos meus irmãos, Ana Paula (um exemplo de que com determinação, perseverança e fé, todos os sonhos são possíveis de serem realizados), e ao Paulo Aurélio, pelos auxílios nos momentos de apuros com a informática.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Maricê de Oliveira, pelos ensinamentos, pelo apoio e orientação para concretização deste trabalho e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

A todos os meus amigos e amigas pelos anos de amizade, cumplicidade, ensinamentos e incentivo nesta fase na minha vida. Em especial, à Raquel De Paula Freitas, Ana Carolina Florence, Ana Paula ES, Adriane Elisabete C. Antunes pela contribuição no meu crescimento científico.

Ao querido Thomaz G. Domingues pela cumplicidade, carinho e paciência, além de todo auxílio na disciplina de Matemática.

À todos os colegas do grupo de pesquisa TecLaFa (Tecnologia de Lácteos Funcionais e Análogos) e técnicos do laboratório por todo auxílio em análises, convivência diária e aprendizado, assim como os responsáveis pelo setores administrativos e secretaria: Mirian, Juarez e Elza.

Às minhas amigas, frutos do período em que estive desenvolvendo este estudo: Estela Gonçalves, Adelaida, Roberta Claro, Roberta Polak, Fabiana Marti, Cristina Bogsan, Ana Paula Marafon, e Elizabeth Harummy pela presença e atenção constante.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pelos ensinamentos e por contribuírem com meu crescimento científico.

Ao Prof. Nagendra P. Shah pelas sugestões e críticas que só agregaram melhorias a este trabalho.

À Leila Bonadio, pela correção das referências e ao Jorge Lima, pela revisão do texto.

À Danisco, pelo fornecimento da cultura probiótica.

À Globalfood, por disponibilizar seus funcionários e a Planta-Piloto para a elaboração das matrizes.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio a pesquisa.

A todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios,
Incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas
E se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si,
Mas ser capaz de encontrar um oásis
No recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “não”.
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta.
Pedras no caminho?
Guardo todas,
um dia vou construir um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Leite	3
2.1.1. Leite Humano e Alimentos para fins especiais	3
2.2. Fórmulas Infantis	5
2.2.1 Regulamentação de fórmulas infantis	7
2.3. Os alimentos funcionais e probióticos	12
2.4. Microbiota humana	16
2.5. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i>	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Materiais	23
4.2. Métodos	23
4.2.1 Planejamento experimental e procedimento experimental	23
4.2.2 Contagem de células viáveis	27
4.2.3 Análises químicas	28
4.2.4 Análise estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Caracterização química das matrizes lácteas e não lácteas	30
5.2 Perfil cinético de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 em matrizes lácteas e não lácteas	34
5.3 Contagem de células viáveis e em fórmulas infantis fermentadas por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	39
5.4 Contagem de células viáveis e em fórmulas infantis adicionadas de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	43
5.5 Evolução do valor de pH e da acidez de fórmulas probióticas lácteas e não lácteas fermentadas por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante o armazenamentos a 4 °C	47
5.6 Evolução do valor de pH e acidez de fórmulas probióticas lácteas e não lácteas adicionadas de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	51
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema CINAC (<i>Cinétique d'acidification</i>)	27
Figura 2. Evolução do pH em função do tempo de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 a 42 °C até o pH 4,7	34
Figura 3. Tempo (h) para atingir pH 4,7 de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 a 42 °C	38
Figura 4. Evolução da contagem de células viáveis de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 fermentadas em matrizes lácteas	39
Figura 5. Evolução da contagem de células viáveis de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 fermentadas em matrizes não lácteas	41
Figura 6. Evolução da contagem de células viáveis de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 adicionadas em matrizes lácteas	43
Figura 7. Evolução da contagem de células viáveis de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 adicionadas em matrizes não lácteas	45
Figura 8. Evolução do valor de pH de fórmulas infantis probióticas antes (d0) e aos um (d1), três (d3), sete (d7), 14 (d14) e 21 (d21) dias após a fermentação por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	47
Figura 9. Evolução da acidez (ácido láctico) de fórmulas infantis probióticas antes (d0) e aos um (d1), três (d3), sete (d7), 14 (d14) e 21 (d21) dias após a fermentação por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	50
Figura 10. Evolução do valor de pH e da acidez de formulados probióticos lácteos e não lácteos fermentados por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	52
Figura 11. Evolução do valor de pH e da acidez de formulados probióticos lácteos e não lácteos não fermentados adicionadas de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 durante armazenamento a 4 °C	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmulas infantis comerciais disponíveis, composição e indicações	11
Tabela 2. Planejamento experimental para estudar a viabilidade de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 em diferentes matrizes alimentares fermentadas ou não durante armazenamento a 4 °C	26
Tabela 3. Caracterização química* das matrizes lácteas e não lácteas em base úmida	33
Tabela 4. Parâmetros cinéticos de acidificação de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 a 42 °C até pH 4,7.	36

LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS

ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
AOAC	ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
APP	Academia Norte-Americana de Pediatria
B. lactis	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa HN019, Danisco
°C	Graus Celsius
Cinac	<i>Cinetique d' Acidification</i>
Codex	Programa conjunto da FAO/ OMS para o desenvolvimento de normas alimentares.
Alimentarium	alimentares.
D0	Análise da contagem de bactérias no momento da inoculação no leite
D1	Dia 1 após 24h de armazenamento a 4 °C
D3	Dia 3 após 24h de armazenamento a 4 °C
D7	Dia 7 após 24h de armazenamento a 4 °C
D14	Dia 14 após 24h de armazenamento a 4 °C
D21	Dia 21 após 24h de armazenamento a 4 °C
ESPGHAN	Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa HN019, Danisco
FPL	Fórmula de Partida láctea
FSL1	<i>Fórmula Sequencial láctea</i>
FSL2	<i>Fórmula Sequencial láctea</i>

FPNL	Fórmula de Pártida não-láctea (extrato hidrossolúvel de soja)
FSNL1	Fórmula de Sequencial não-láctea (extrato hidrossolúvel de soja)
FSNL2	Fórmula de Sequencial não-láctea (extrato hidrossolúvel de soja)
log₁₀	Logaritmo na base 10
OMS/ WHO	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
pH_{V_{max}}	pH no qual V _{max} é atingida
TGI	Trato gastrointestinal
t_{pH 5,5}	Tempo para atingir pH 5,5
t_{pH 4,7}	Tempo para atingir pH 4,7
t_{V_{máx}}	Tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação
UFC.g⁻¹	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC.mL⁻¹	<i>Unidades formadoras de colônia por mililitro</i>
upH	Unidades de pH
upH/min	Unidades de pH por minuto
V_{max}	Velocidade máxima de acidificação

SOUSA, A.L.P.; OLIVEIRA, M.N. Viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis probióticas durante armazenamento a 4 °C. São Paulo. 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis fermentadas ou não, probióticas durante armazenamento a 4 °C. Três matrizes lácteas e três não lácteas (a base de soja) foram utilizadas para a elaboração de produtos fermentados ou não fermentados usando *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, resultando em doze diferentes fórmulas probióticas para lactentes. O perfil de acidificação foi determinado a 42 °C até pH 4,7. Determinações físico-químicas (sólidos totais, proteína, gordura, cinzas, carboidratos, calorias, densidade e pH) foram realizadas e foram focadas as contagens de bactérias viáveis durante o armazenamento refrigerado. A caracterização química dos produtos lácteos e a não lácteos apresentou resultados diferentes, à exceção FSL2, todos estavam de acordo com Codex Alimentarius. O perfil de acidificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 diferiu conforme a matriz. Durante o armazenamento dos produtos a 4 °C, a contagem de bactérias viáveis de acordo com o preconizado, bem como a pós-acidificação, estando em conformidade com as recomendações da legislação brasileira. Processo (fermentação ou adição) e tipo de matriz (lácteos e não lácteos) influenciaram a pós-acidificação e a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019. As fórmulas para lactentes podem ser considerados bons veículos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019.

Palavras-chave: Fórmulas Infantis. Probiótico. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Viabilidade.

SOUSA, A.L.P.; OLIVEIRA, M.N. Viability of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019 in probiotic infant formulas. São Paulo. 2011. Dissertation (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University.

ABSTRACT

This study proposed to study infant formulas as vehicles for *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019. Three dairy and three non-dairy matrices were employed for the preparation of fermented or unfermented products using *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019 resulting in twelve different probiotic infant formulas. Acidification profile of the probiotic was determined at 42 °C until pH 4.7. Physicochemical determination (total solids, protein, fat, ash, carbohydrates and calories, density and pH) was conducted, and counts viable bacteria (in dairy and non dairy infant formulas fermented and unfermented) during cold storage was focused on. The chemical characterization of the dairy and non-dairy matrix showed different results, the exception FSL2, all were in accordance to the Codex Alimentarius. The acidification profile of *B. animalis* ssp. *lactis* HN019 differed according to the matrix. During storage of products at 4 °C counts of viable bacteria were stable as well as post-acidification, and were in accordance with the recommendations of the Brazilian legislation. Process (fermentation or addition) and matrix type (dairy and non-dairy) influenced post-acidification and viability of *B. animalis* ssp. *lactis* HN019 . Infant formulas could be considered good vehicles for *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019.

Keywords: Infant formula; Probiotic; Viability; *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

1. INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro e possivelmente o mais complexo dos alimentos ingeridos pelos humanos e demais mamíferos, visto que apresenta adequado equilíbrio de macro e micronutrientes, fatores de crescimento e imunoglobulinas, satisfazendo todas as necessidades nutricionais dos recém-nascidos nos primeiros meses. Existe consenso de que crianças devem beber leite; contanto, algumas podem apresentar hipersensibilidade às proteínas do produto, galactosemia, deficiência de galactosidase ou intolerância à lactose ou algum outro fator impeditivo (ANTUNES; PACHECO, 2009).

O leite materno é um alimento rico em gordura, minerais, vitaminas, enzimas e imunoglobulinas, as quais são responsáveis pela proteção contra alguns tipos de doenças. Esse leite é composto principalmente por 87% de água e, os restantes 13%, por uma combinação de elementos essenciais para o desenvolvimento da criança (SILVA; GIOIELLI, 2009).

Os novos conhecimentos sobre a composição do leite materno têm permitido o aprimoramento das fórmulas para lactentes. As fórmulas para lactentes modificaram-se constantemente nos últimos anos, em virtude de novos conhecimentos sobre nutrientes que devem ser utilizados em maior ou menor quantidade ou acerca de novos componentes a incorporar às fórmulas (CAMPOS *et al.*, 2008).

Durante as últimas duas décadas, micro-organismos probióticos foram adicionados a três grandes grupos de produtos comerciais: alimentos infantis, formulações farmacêuticas e produtos lácteos. Porém, os produtos lácteos destacam-se pela maior variedade, sendo constituídos por iogurtes, sorvetes, leites fermentados e queijos, nos quais se utilizam frequentemente culturas iniciadoras e bifidobactérias ou lactobacilos como aditivos e suplementos na forma de cápsulas. Os leites fermentados, as bebidas lácteas e os iogurtes são os mais consumidos (HOIER, 1992; RYBKA; KAILASAPATHY, 1995, OLIVEIRA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; GOMES; MALCATA, 1999).

Os leites fermentados por bactérias probióticas, quando consumidos diariamente, são capazes de prevenir problemas gastrointestinais, algumas formas de câncer, inibir o crescimento de *Helicobacter pylori* e diminuir diarreias ocasionadas por síndrome do intestino irritável (GOTTELAND *et al.*, 2006).

Dentre as culturas probióticas, as bifidobactérias possuem relevante importância do ponto de vista industrial, com grande potencial de mercado na indústria alimentícia tanto nacional quanto internacional. Estão sendo aplicadas em muitos alimentos fermentados

láceos, devido às suas propriedades tecnológicas e aos seus efeitos em interação com os mecanismos metabólicos do organismo, por estarem associadas com a diminuição na incidência de alergias, melhor digestão da lactose, entre outros benefícios (BJÖRKSTÉN *et al.*, 2001; GONÇALVES; EBERLE, 2009).

Fórmulas em pó contendo probióticos para lactentes e crianças tornaram-se populares em todo o mundo, nas quais, em particular, as bifidobactérias são frequentemente empregadas. Uma possível razão para esta tendência é que o gênero *Bifidobacterium* é amplamente distribuído em diversos nichos ecológicos e no trato gastrointestinal e geniturinário humano, constituindo a microbiota predominante em crianças logo após o nascimento (GOMES; MALCATA, 1999; MAGNE *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2010). Apesar da estabilidade de bifidobactérias em iogurte e queijo ter sido investigada em pormenor, até o presente não há nenhum relato sobre a estabilidade dos probióticos nas fórmulas em pó, especialmente nas comercializadas em mercados para recém-nascidos ou crianças pequenas (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; PHILIPS *et al.*, 2006).

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* HN019, originado de lácteos, foi considerado um probiótico em potencial, baseado em sua capacidade de resistir à bile e a pH bem ácidos *in vitro*. Essa estirpe foi capaz de aderir em quantidade elevada e em diferentes tipos de células de epitélio intestinal (GOPAL *et al.*, 2001).

É muito importante para ambos, fabricantes e consumidores, conhecer a estabilidade dos probióticos em fórmulas em pó. Em particular, a contagem viável de probióticos em fórmulas em pó no final de vida útil e os efeitos da temperatura de armazenamento na estabilidade dos probióticos no produto final são interessantes tópicos de investigação (FUMIAKI *et al.*, 2009).

Em vista do exposto, este estudo se propôs a estudar fórmulas infantis comerciais como veículo para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019. Determinações físico-químicas (sólidos totais, densidade, proteína, gordura, carboidratos e calorias, cinzas e acidez e pH) foram realizadas e foi enfocada a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em formulados infantis probióticos lácteos e não lácteos fermentados ou adicionados do probiótico durante o armazenamento a 4 °C.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leite

O leite é um líquido de composição complexa, cujas propriedades físicas variam de uma espécie para outra. Esse alimento apresenta-se como uma emulsão líquida, formada por água e substâncias hidrossolúveis, em fase contínua, e, em fase interna ou descontínua, formada principalmente de micelas de caseína e de glóbulos de gordura (SGARBIERI, 2005; PENNA; ALMEIDA, 2009).

O leite de vaca é composto principalmente por água, aproximadamente 4,8% de lactose, 3,2% de proteína, 3,7% de gordura, 0,19% de compostos não proteicos e 0,7% de teor de cinzas, além de vitaminas, minerais e ácidos graxos essenciais. Dentre os elementos minerais, destaca-se o cálcio, responsável pelo fortalecimento dos ossos e da manutenção da homeostasia de diversos sistemas do organismo (GNÄDIG; XUE, 2003). Também é constituído de alguns microelementos e de certos aminoácidos – essenciais para o funcionamento de diversos complexos enzimáticos, fisiológicos e metabólicos nos mamíferos (JOHNSON; GIULIVI, 2005).

O leite é provavelmente a mais adaptável e a mais flexível de todas as matérias-primas alimentícias, sendo uma matriz altamente empregada no desenvolvimento de diversos produtos lácteos, como iogurtes, leites fermentados, queijos, além de base para outros alimentos.

2.1.1. Leite humano e alimentos para fins especiais

O leite humano é o único alimento energético, nutricional e imunológico consumido em quantidades suficientes pelos recém-nascidos (MEGRAUD *et al.*, 1990). Sua composição apresenta todos os nutrientes em quantidade e qualidade necessárias, além de fornecer proteção contra infecções e alergias e estimular o sistema imunológico (MADUKO *et al.*, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a amamentação materna de forma exclusiva durante os primeiros seis meses de vida (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1989).

A composição do leite humano é particular. A fração lipídica do leite humano contém de 3 a 5% de lipídios, dentre os quais 98% são de triacilgliceróis, 1% de fosfolipídios e 0,5% de esteróis, além de conter ácidos graxos essenciais, que são necessários para o desenvolvimento neural (AGOSTONI; HASCHKE, 2003).

O teor proteico do leite humano é composto por 80% de lactoalbumina, enquanto o leite de vaca apresenta esse mesmo teor em caseína, ou seja, uma relação proteínas do soro/caseína inversamente proporcional. Essa menor concentração em caseína resulta na formação de coágulo gástrico de maior digestibilidade e com baixo poder alergênico (AGOSTONI; HASCHKE, 2003; SILVA *et al.*, 2007), além de conter maiores concentrações de aminoácidos essenciais de alto valor biológico, como cistina e taurina, que são fundamentais ao desenvolvimento do sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2007).

Assim como no leite bovino, o principal carboidrato no leite humano é a lactose, um dissacarídeo formado por galactose e glicose, que é produzida pelas células epiteliais da glândula mamária, sendo a principal fonte de energia dos recém-nascidos (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003). A concentração de lactose é de cerca de 4% no colostro e de até 7% no leite maduro. Dentre os diversos benefícios atribuídos à lactose estão a facilitação da absorção de cálcio e ferro e a promoção da colonização intestinal com estirpes de bifidobactérias (SILVA; GIOIELLI, 2009).

Apesar de todos os esforços em estimular o aleitamento materno, alguns recém-nascidos não são amamentados no peito, devido à baixa produção de leite, ao estado nutricional, à condição de saúde desfavorável da lactante ou mesmo por apresentarem hipersensibilidade às proteínas do leite materno, galactosemia, deficiência de galactosidase ou intolerância à lactose, ou algum outro fator impeditivo (SILVA; GIOIELLI, 2009; ANTUNES; PACHECO, 2009).

Consequentemente, a Academia Americana de Pediatria (AAP) recomenda o uso de fórmulas infantis específicas e fórmulas à base de soja para pacientes intolerantes e alérgicos com idade superior a seis meses, a fim de fornecer meios alternativos de alimentação para aqueles recém-nascidos que não podem ser amamentados (AMERICAN ACADEMY OF

PEDIATRICS, 1976; BHATIA; GREER, 2008). Como a demanda por alternativas ao leite humano é contínua, um substituto para o leite humano deve ser tão próximo quanto possível do original, para atender às exigências nutritivas do crescimento infantil e substituir o leite materno nestes casos (SILVA; GIOIELLI, 2009).

Assim, existe demanda para o desenvolvimento de alimentos especialmente formulados ou processados, nos quais se introduzem modificações no conteúdo de nutrientes, atendendo às necessidades de indivíduos em condições metabólicas e fisiológicas específicas, seguindo a legislação vigente (ANVISA, 1998; JOHANSSON *et al.*, 2001).

2.2. Fórmulas infantis

O trato gastrointestinal de recém-nascidos é deficiente quanto ao sistema de defesa específico e inespecífico e, muitas vezes, sua capacidade digestiva não foi totalmente desenvolvida. Muitas propriedades do leite materno são capazes de compensar essas deficiências, por conterem imunoglobulinas e enzimas digestivas. Em contrapartida, a suplementação alimentar contém, em sua grande maioria, proteínas ou algum derivado do leite de vaca que podem provocar reações alérgicas e retardar o esvaziamento gástrico, embora a grande maioria das crianças seja capaz de tolerar bem esses suplementos (SAARINEN *et al.*, 1999).

Os novos conhecimentos sobre a composição do leite materno têm permitido o aprimoramento das fórmulas para lactentes. As fórmulas para lactentes modificaram-se constantemente nos últimos anos, em virtude de novos conhecimentos sobre nutrientes que devem ser utilizados em maior ou menor quantidade ou acerca de novos componentes a incorporar às fórmulas (CAMPOS *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de substitutos para o leite humano é comumente feito empregando-se leite de outros mamíferos ou mesmo extrato hidrossolúvel de soja, através de uma gama de modificações complexas para atender as necessidades da criança. Os novos conhecimentos relacionados à composição química e nutricional do leite humano, ou de mamíferos em geral, têm possibilitado a elaboração de fórmulas mais refinadas, cuja

composição química se assemelha ao leite humano (AGGETT, AGOSTINI *et al.*, 2001; LORENTE *et al.*, 2009).

Um estudo de revisão realizado por Joeckel e Phillips (2009) apresentou os diferentes tipos de fórmulas e suas indicações para o uso por lactentes e crianças na prevenção ou no tratamento de doenças. Afinal, cada criança tem necessidades individuais, os lactentes e as fórmulas pediátricas disponíveis são distintos. Não só existem várias categorias de fórmulas, incluindo as com proteínas de origem láctea, as com proteínas à base de soja, as com hidrolisado proteico e as compostas por aminoácidos, como também há diferenças entre os produtos dentro de cada categoria.

As fórmulas para lactentes devem atender às necessidades de crianças a termo normais e aquelas com necessidades especiais, como, por exemplo, crianças com baixo peso ao nascer, com alergias às proteínas do leite ou com desordens metabólicas. Assim, novas fórmulas devem ser desenvolvidas quando grupos de crianças com necessidades nutricionais são identificados (CAMPOS *et al.*, 2008). A revisão publicada por Thomas *et al.* (2010) descreve as utilizações médicas de probióticos e prebióticos como suplementos alimentares adicionados a produtos alimentares comercializados para crianças, incluindo as fórmulas infantis e resume seus efeitos benéficos à saúde. Recomenda aos pediatras e profissionais da área da saúde como tomar decisões apropriadas e indicar a utilidade e os benefícios dos suplementos para seus pacientes.

A composição do leite humano serve como referência para melhorar as fórmulas para lactente, no entanto, contém células vivas, hormônios, enzimas ativas, imunoglobulinas e componentes com estruturas moleculares que não podem ser sintetizados artificialmente (AGOSTONI; HASCHKE, 2003). Deste modo, o aprimoramento tecnológico na preparação das fórmulas tem permitido queda da contaminação bacteriana e melhorias no coágulo do leite. Desde então, novas fórmulas têm sucedido outras, a fim de se encontrar a que atenda às necessidades nutricionais básicas da criança (FOMON, 2001).

No mercado atual, existem diversas fórmulas infantis específicas para a suplementação dietética de crianças impossibilitadas de receberem o aleitamento materno. Dentre elas, as fórmulas de partida, fórmulas de seguimento ou sequência, fórmulas à base de soja, fórmulas isentas de lactose, fórmulas antirregurgitação, fórmulas semielementares, fórmulas

elementares e fórmulas para prematuros e/ou recém-nascidos de baixo peso (MONTES; GIULIANE, 2004).

Atualmente, existem indicações para a aplicação de formulações probióticas infantis a recém-nascidos e crianças alérgicas à proteína do leite da vaca, intolerantes à lactose, auxiliando na redução dos episódios de regurgitação (MORAIS, 2006 a,b). Esse novo apelo se deve principalmente ao fato de que a microbiota de crianças é predominantemente composta por bifidobactérias, que podem exercer efeitos protetores benéficos contra infecções entéricas (THIBAUT *et al.*, 2004).

Lugonga *et al.* (2010) realizaram um estudo *in vitro* e teste clínico, investigativo e comparativo do efeito bifidogênico de fórmula infantil suplementada com inulina e frutooligosacarídeos (4g/l) no leite humano. O estudo perdurou por 28 dias e as fezes de 21 crianças de ambos os sexos (com menos de 6 meses de idade) foram analisadas. As crianças foram divididas em dois grupos: (i) recebendo a fórmula infantil; (ii) recebendo o leite humano. Análises microbiológicas e bioquímicas das fezes foram realizadas nos períodos D0, D14 e D21 dias, visando investigar as mudanças induzidas pela ação das bifidobactérias presentes nas fezes. Verificou-se que não houve diferença significativa do número de bactérias do gênero lactobacilos; aeróbios totais; anaeróbias; bolores e leveduras fecais. Em contraste, o número de bifidobactérias encontradas nas fezes foi semelhante entre os grupos. O consumo de fórmula infantil adicionada de inulina e frutooligosacarídeos estimulou o efeito bifidogênico em ambos os testes. Concluiu-se que, o ensaio clínico e *in vitro* pode, de forma rápida e objetiva, determinar o efeito bifidogênico de fórmula infantil, indicando a sua qualidade da fórmula infantil. No entanto, é necessário o desenvolvimento de outros ensaios clínicos.

2.2.1 Regulamentação de fórmulas infantis

Atualmente, são grandes as possibilidades de enriquecimento de alimentos com micronutrientes, probióticos e prebióticos, assim como as oportunidades de formulação de novos produtos que proporcionem mais conforto, prazer e melhores condições de saúde para o consumidor (PONTES *et al.*, 2009).

Todas as padronizações alimentares e orientações relacionadas à proteção da saúde do consumidor são preconizadas por comissões como o Codex Alimentarius, a Academia Americana de Pediatria e a ESPGHAN (Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição) (KOLETZKO *et al.*, 2005).

Existem órgãos específicos que estabelecem e revisam normas para alimentos, visando garantir, ao consumidor, segurança, além de facilitar o comércio. Dentre os mais referidos na literatura, para assegurar produtos para fins especiais, como as fórmulas infantis, estão a Agência Nacional em Vigilância Sanitária, que estabelece legislação específica para a regulamentação na definição, na produção e na comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância, a Academia Americana de Pediatria (AAP), a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Codex *Alimentarius* (Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação e da Organização Mundial da Saúde) e Comissão dos Comitês Europeus (ESPGHAN), que organizam-se em vários comitês de nutrição ativos e lidam com diversos temas relacionados a alimentos, tais como composição de produtos e segurança do produto (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1976; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1989; KOLETZKO; BAKER, 2005; ANVISA, 2006; BHATIA; GREER, 2008; KHAN, 2008; MAcLEAN *et al.*, 2010).

A ANVISA define algumas fórmulas infantis como: (i) de partida para lactentes é o produto em forma líquida ou em pó destinado à alimentação de lactentes até o sexto mês, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfação das necessidades nutricionais desse grupo etário; (ii) de seguimento para lactentes é destinada a alimentação de lactentes – a partir dos seis meses de idade, para substituição do leite materno e, (iii) de seguimento para crianças de primeira infância, destinada a crianças de 12 meses a 3 anos de idade, utilizado como substituto de primeira infância (ANVISA, 2006).

Como revisado por Joeckel *et al.* (2009), cada criança apresenta necessidades individuais, além de existir uma diversidade de lactentes. A fim de atendê-los, fórmulas pediátricas com composições diversificadas estão disponíveis no mercado. Existem várias categorias de fórmulas: incluindo as de base lácteas, as à base de soja, as à base de hidrolisado proteico e as de aminoácidos, como preocupação com o desenvolvimento dessas, visando utilização na prevenção ou tratamento de doenças. A Tabela 1 sintetiza alguns tipos de fórmulas infantis disponíveis, assim como e suas indicações.

Há anos, a Academia Americana de Pediatria (AAP) recomenda o leite humano como a fonte ideal de nutrição para a alimentação infantil. Entretanto, nos casos em que o aleitamento materno não é possível, recomenda-se a inserção de fórmula à base de leite, como segunda escolha, e fórmula de soja, em terceira opção.

Em 2008, a AAP estabeleceu as indicações e contraindicações para o uso de fórmulas de soja (BHATIA, 2008). As restrições às indicações de fórmulas à base de soja representam 20-25% no mercado de fórmula nos Estados Unidos. Entretanto, nos primeiros dois meses de vida, grande parcela – aproximadamente 20 milhões das crianças na América do Norte – está recebendo, pelo menos uma das fórmulas infantis à base de soja, que estão disponíveis no comércio desde 1970 (LASEKAN JB, 1999; MERRITT; JENKS, 2004). Devido aos rigorosos padrões da indústria e do governo para a formulação de fórmulas infantis, nenhuma diferença significativa discernível quanto ao crescimento, ao desenvolvimento ou à saúde foi relatada quando crianças ingeriram fórmulas à base de soja, comparadas com fórmulas lácteas, durante o primeiro ano de vida (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, COMMITTEE ON NUTRITION, 1998).

Poucos estudos mediram o crescimento de longo prazo em crianças alimentadas com fórmulas à base de proteína de soja. Lasekan *et al.* (1999) avaliaram, através de estudo clínico (randomizado, duplo-cego, com placebo), durante um ano, o crescimento de bebês alimentados com fórmulas à base de proteína de soja. O estudo se constituiu em três tratamentos: o grupo que recebeu doses diárias de “leite de soja”, outro grupo que recebeu o “leite de soja” suplementado com nucleotídeos de origem humana e grupo placebo, que recebeu as alimentações citadas acima, ou seja, mistas. O grupo que recebeu a alimentação mista foi exclusivamente alimentado do nascimento até os dois meses de idade; a seguir, recebeu fórmula láctea padronizada (Similac® contendo ferro) até completar um ano de idade. Os resultados indicaram que o crescimento (peso, comprimento e circunferência da cabeça) foi normal e comparável entre os três grupos. Todos os três grupos apresentaram albumina plasmática (aos dois meses de idade) e níveis de hemoglobina similares em 12 meses de idade. Assim, o estudo demonstrou crescimento similar no primeiro ano de vida entre as crianças ingerindo alimentação mista ou fórmula de soja suplementada (ou não) com aminoácidos de leite humano.

Apesar de todos os esforços em estimular o aleitamento materno, a urbanização e a falta de tempo reduziram o período de amamentação. Além disso, alguns recém-nascidos não são amamentados devido à baixa produção de leite, estado nutricional e condição de saúde desfavorável da lactante – ou até em função da morte da mãe durante ou após o parto. Consequentemente existe a necessidade de fornecer meios alternativos de alimentação para aqueles recém-nascidos que não podem ser amamentados (MADUKO *et al.*, 2007; CAMPOS *et. al.*, 2008; SILVA; GIOIELLI, 2009; THOMAS *et al.*, 2010).

Tabela 1. Fórmulas infantis comerciais disponíveis, composição e indicações.

	Prevalência	Proteína	Gordura	Ácidos graxos	Carboidratos	Não recomendado	Recomendado	Referência
Láctea	****	Caseína e soro; Proteína parcialmente hidrolisada	Buttermilk substituído por óleo vegetal	Adicionado DHA e ARA	Lactose ou xarope de milho	Alérgicos a proteína de leite de vaca; intolerantes a lactose/ galactose	Pós amamentação; na impossibilidade de aleitamento materno	Silva; Gioielli, 2009; Koletzko <i>et al.</i> , 2005; Joeckel <i>et al.</i> , 2009
Extrato hidrossolúvel de soja	***	Proteína de soja			Carragena	Prematuros de baixo peso (<1800g); crianças com enteropatia ou enterocolite induzida por alergia a proteína do leite de vaca	Intolerantes a lactose/ galactose; Alérgicos a proteína do leite de vaca	Bhatia <i>et al.</i> , 2008; American Academic of Pediatrics, 1983, 1998; Mendez <i>et al.</i> , 2002; Koletzko <i>et al.</i> , 2005; Joeckel <i>et al.</i> , 2009.
Hidrolisado protéico	**	Peptídeos de caseína e soro; amino-ácidos livres		Ácidos graxos de cadeia longa e média		Crianças com problema renal; fibrose cística; cólicas severas e refluxo para 2% da população	Alérgico a proteína de leite de vaca e soja intactas	Joeckel <i>et al.</i> , 2009
Aminoácido	*	100% amino-ácidos livres				Extrema hipersensibilidade a proteína; crianças com intestino curto		Joeckel <i>et al.</i> , 2009

***** prevalência no pós aleitamento materno

DHA: ácido docosahexanóico

ARA: ácido araquedônico

2.3. Os alimentos funcionais e probióticos

Alimentos que, além da nutrição básica, beneficiam a saúde de um indivíduo são denominados como alimentos funcionais. Estes alimentos promovem a saúde, sendo fontes de prevenção e não de cura de doenças. A busca pela prevenção de doenças crônicas, causadas por maus hábitos alimentares, e o desejo de melhorar a qualidade de vida têm impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de alimentos funcionais, ou seja, aqueles alimentos que apresentam, além de características nutricionais e tecnológicas adequadas, componentes que exercem funções biológicas, como competição pelo sítio onde patógenos poderiam aderir, a diminuição do colesterol sérico e do risco de doenças cardiovasculares, entre outras (SAAD *et al.*, 2006; VASILJEVIC; SHAH, 2008; ROBERFROID, 2002).

Os alimentos e os ingredientes funcionais, além de compreenderem aqueles que contêm naturalmente substâncias bioativas, são representados pelos alimentos denominados probióticos, prebióticos e simbióticos (LEROY; DE VUYST, 2004).

O termo “probiótico” surgiu em 1965 e foi empregado por Lilley e Stillwell (1965) para descrever “substâncias secretadas por um micro-organismo para estimular o crescimento de outro”, desempenhando, portanto, efeito oposto ao dos antibióticos. Desde então, várias definições foram feitas para os probióticos, dependendo de seus efeitos sobre a saúde do hospedeiro, sendo atualmente a definição mais aceita aquela adaptada pelo grupo misto formado pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO) e também pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA): probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, promovendo efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (FULLER, 1992; FAO/ WHO, 2002; LJUNGH; WADSTRÖM, 2006; SALMINEN; ISOULARI, 2006; ANVISA, 2007; BADARO, 2008; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A regulamentação de substâncias bioativas e de probióticos isolados com alegação de propriedades funcional ou de saúde é responsabilidade da vigilância sanitária, cujo órgão máximo no Brasil é a ANVISA. Um dos problemas atuais da

regulamentação de tais produtos é o registro do mesmo, mais especificamente, nos termos presentes na rotulagem, que devem estar de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 19, de 30 de abril de 1999. Esta resolução estabelece o “Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais ou de saúde em sua rotulagem” (ANVISA, 1999).

O emprego de culturas probióticas como agentes multifuncionais promotores da saúde e do bem-estar tem aumentado em virtude dos estudos científicos comprovando sua eficácia terapêutica e sua ação no equilíbrio da microbiota intestinal, proporcionando manutenção da saúde corpórea. Paralelamente, existe um enfoque sobre a função do intestino humano, que deixou de ser visto apenas como um tubo digestivo para ser reconhecido como o principal alvo de respostas imunitárias (ANTUNES *et al.*, 2007; ANDLAUER; FÜRST, 2002).

O mercado global de alimentos funcionais movimenta mais de 33 bilhões de dólares, com crescimento anual de 5% (SIRÓ *et al.*, 2008). Um alimento pode ser considerado funcional se, além do efeito nutricional adequado, afetar beneficemente uma ou mais funções no organismo de forma melhorar o estado de saúde e/ou reduzir o risco de doenças (SAXELIN *et al.*, 2003; STANTON *et al.*, 2005. Em 1996 (DAVE; SHAH, 1996) reportaram a existência de aproximadamente 100 produtos funcionais contendo probióticos disponíveis no mercado mundial. Atualmente, há estimativa de que o mercado de alimentos funcionais movimenta cerca de 50 milhões de dólares no mundo e cresça aproximadamente 10% ao ano, índice três vezes maior que o de produtos alimentícios convencionais, sendo que no Brasil, entre as 24 categorias de alimentos mais vendidos em 2005, 75% possuem apelo especial à saúde (RAUD, 2008).

Em geral, os micro-organismos probióticos são veiculados a alimentos fermentados, como queijo, iogurte e leite fermentado. Acredita-se que o consumo de 10^8 a 10^{11} g/mL de produto ao dia é necessário para que sejam percebidos efeitos benéficos à saúde (SAARELA *et al.*, 2000; REIG; ANESTO, 2002, OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

Inúmeros estudos foram realizados para comprovar o poder modulador de determinados micro-organismos na saúde dos hospedeiros, tais como imunomodulação, infecções relacionadas ao trato respiratório e supressão de alergias, melhor digestão da lactose, tratamento da diarreia, atividade supressiva contra patógenos gastrintestinais

tais como *Helicobacter pilory*, *Salmonella typhimurii*, *Giardia intestinalis*, constipação, síndrome do intestino irritável, supercrescimento bacteriano no intestino, prevenção de câncer de cólon e de bexiga, controle dos níveis de colesterol, controle da hipertensão, infecção do trato urinário (HUDAULT *et al.*, 1997; HOLPZAPFEL *et al.*, 1998; GOLDIN, 1998; SALMINEM *et al.*, 1998; MATTILA-SANDHOM *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2001; De VRESE *et al.*, 2001; MICHETTI, 2001; OUWEHAND *et al.*, 2003; LEAHY *et al.*, 2005; COMMANE *et al.*, 2005; SAAD, 2006; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Segundo Naidu *et al.* (1999) e Ferreira (2003), para o uso em alimentos, os probióticos não devem apenas sobreviver à passagem pelo trato digestivo, mas também devem ter a capacidade de aderir e se proliferar na mucosa intestinal. Os mecanismos empregados na adesão, em muitos casos, não são muito definidos. Mas sabe-se que a produção de proteínas, glicoproteínas e carboidratos especificamente para esse fim ou devido a componentes da própria membrana celular ajudaria na aderência. Entretanto, bactérias em trânsito pelo intestino também podem exercer efeitos positivos sem a aderência propriamente dita; é o caso das bactérias do iogurte, por exemplo, que hidrolisam a lactose presente no produto lácteo e não aderem ao intestino, permanecendo na superfície da mucosa intestinal.

Muitos micro-organismos têm sido estudados para ser utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, a fim de melhorar a qualidade nutricional e terapêutica. Porém, tais micro-organismos devem atender a critérios rigorosos de saúde e de comprovação clínica de promoção de saúde. Assim, um micro-organismo deve apresentar os seguintes requisitos: ser preferencialmente de origem humana; ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, pelo suco gástrico e sais biliares; colonizar o intestino, ao menos temporariamente; ser metabolicamente ativo e produzir efeitos benéficos enquanto presente no intestino, permanecer viável no alimento até o momento do consumo. A quantidade mínima necessária de 10^6 UFC.mL⁻¹ ou g ao dia têm sido recomendada por diversos autores (KIM, 1998; SAAD, 2006; OLIVEIRA; DAMIM, 2003; VASILJEVIC; SHAH, 2008; ANVISA, 2007).

As principais culturas probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Existem 56 espécies de lactobacilos e 29 espécies de bifidobactérias

descritas, das quais somente algumas foram extensivamente avaliadas por estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo atualmente empregadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica como probióticos (SHAH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008). Alguns dos principais gêneros e espécies considerados como probióticos são *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. lactis*.

Segundo Hoier (1992) e Tannock (2009), é aconselhável que os micro-organismos probióticos sejam de origem humana, tais como *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* e *Enterococcus faecium*. Desta forma, tais culturas serão compatíveis com o ambiente intestinal e adequadamente toleradas pelo sistema imunológico do hospedeiro. Adicionalmente, algumas propriedades, como funcionalidade, aspectos tecnológicos e segurança, devem ser avaliadas para a seleção destas bactérias (como amplamente descritas por Vasiljevic e Shah, 2008).

Quando as culturas probióticas aderem ao epitélio intestinal ocupam um espaço na sua superfície, ou seja, um sítio de colonização. Este mecanismo pode desalojar ou dificultar instalação de outras bactérias. Em geral, *Bifidobacterium* ssp. adere melhor que *L. acidophilus*, sendo que *B. infantis* e *B. longum* apresentaram as melhores propriedades de aderência, segundo pesquisa de Lankaputhra e Shah (1998).

As atividades antimicrobianas das bifidobactérias e dos lactobacilos diferem em vários aspectos. Lactobacilos atuam através da produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, enquanto as bifidobactérias liberam ácidos láctico, acético e fórmico, sem geração de CO₂, exceto durante a degradação do glucanato. A produção destes ácidos provoca a redução do pH intestinal, o que restringe ou inibe o crescimento de muitos potenciais patógenos e bactérias putrefativas. Além disso, todas as bifidobactérias de origem humana utilizam galactose, lactose e frutose como fontes de carbono (MODLER *et al.*, 1990; PENNA, 2002; FARNWORTH *et al.*, 2007).

Recentes estudos sobre a relação dos probióticos com a microbiota intestinal em recém-nascidos têm demonstrado que estes micro-organismos, especialmente as bifidobactérias, são muito importantes para a saúde dos bebês. Tanto lactobacilos como bifidobactérias são capazes de induzir a quebra de proteínas com potencial alergênico

no trato gastrointestinal. Esse processo pode contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas, minimizando o risco de alergia alimentar (MAH *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2006).

2.4. Microbiota humana

O conhecimento da importância da microbiota intestinal como um mecanismo ativo de controle de processos infecciosos e da modulação da resposta imunológica estimulou a procura por medidas de tratamento e prevenção de doenças baseadas na restauração da microbiota intestinal ideal. Uma maneira de se conseguir esse efeito foi a observação das características da microbiota intestinal normal e de várias tentativas de reestruturação da mesma, seja por medidas de reposição de micro-organismos benéficos à saúde, seja por substâncias que auxiliam o seu crescimento (CHEN; WALKER, 2005).

O trato gastrointestinal apresenta uma área muito extensa de contato com os alimentos, no qual a mucosa possui vilosidades e microvilosidades, fornecendo o espaço necessário para interações durante o processo digestivo e para a adesão da colonização bacteriana no epitélio (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). Do ponto de vista microbiológico, a microbiota humana faz do intestino um ecossistema dos mais diversificados e metabolicamente ativos. Cada indivíduo apresenta um tipo de colonização que é tão particular como sua própria impressão digital (ZOETENDAL *et al.*, 2001). O estômago e o duodeno são ambientes inóspitos, que contêm números relativamente baixos de micro-organismos. No estômago, devido à presença de ácido clorídrico, grande parte dos micro-organismos potencialmente patogênicos são eliminados. Porém, existe limitado número de bactérias ácido-tolerantes, $\sim 10^2$ - 10^3 UFC.mL⁻¹, que são capazes de sobreviver às condições adversas desta ambiente. Após a passagem pelo estômago, o alimento atinge o duodeno e, em seguida, o íleo. Durante este trajeto, o oxigênio diminui, o pH do bolo alimentar se torna neutro e o número de micro-organismos aumenta de forma progressiva. Entretanto, alguns fatores físicos e químicos limitam o crescimento microbiano (COLLINGON; BUTEL, 2004). A maior e mais diversificada microbiota do organismo humano encontra-se no intestino grosso, mais especificamente

na porção distal do cólon. A microbiota do cólon é muito complexa e é dominada pelas bactérias anaeróbicas estritas, podendo atingir até 10^{12} UFC.g⁻¹ do produto (HELLER, 2001; COLLING *et al.*, 1999).

Assim, no indivíduo com sua microbiota já estabelecida, a influência dos probióticos limita-se, em geral, ao período em que são empregados. Desta forma, para que esses indivíduos mantenham a mudança desejada em sua microbiota intestinal, deverão consumir continuamente e indefinidamente esses micro-organismos (CHEN; WALKER, 2005).

O intestino do feto é estéril. O recém-nascido por parto vaginal apresenta a colonização inicial do tubo digestivo por bactérias da microbiota vaginal e fecal de sua mãe. Por sua vez, os recém-nascidos por cesárea são colonizados por bactérias do ambiente. Além do tipo do parto, o tipo de alimentação (aleitamento natural ou artificial) é muito importante na definição da microbiota intestinal do lactente. O aleitamento natural proporciona microbiota intestinal constituída predominantemente (>90%) por bifidobactérias e lactobacilos. Nos lactentes que recebem aleitamento artificial, essas bactérias correspondem a 40 a 60% da microbiota, no intestino delgado, e, ao atingirem o cólon, estimulam seletivamente uma bactéria ou grupo de bactérias da microbiota (por exemplo, bifidobactérias), proporcionando efeito benéfico à saúde do hospedeiro (MACKIE *et al.*, 1999; FOOKS; GIBSON, 2002).

O *L. acidophilus* é a bactéria benéfica predominante em adultos, enquanto que as bifidobactérias estão mais presentes nas crianças (MITSUOKA, 1990). A proliferação desses micro-organismos é estimulada pela glicoproteína κ-caseína presente no colostro humano e em menor quantidade no leite maduro. A população de bifidobactérias presentes na microbiota intestinal é influenciada pela idade e pela dieta dos indivíduos. As bifidobactérias mais comumente isoladas de crianças são *B. infantis* e *B. breve*, enquanto *B. bifidum*, *B. longum* e *B. adolescentis* são ocasionalmente isoladas de crianças. Por outro lado, *B. adolescentis* e *B. longum* são encontrados no intestino de crianças, adultos e idosos (MITSUOKA, 1990).

As bifidobactérias ajudam a manter a saúde e o bom funcionamento do trato intestinal de forma direta, através de atividade antimicrobiana, ou indiretamente por imunomodulação via células intestinais ou, ainda, modificando a função da microbiota

normal (SCHMIDT; ZINK, 2000). Com o decorrer dos anos de vida, a população de bifidobactérias tende a diminuir gradativamente. Em crianças que recebem leite materno, as bifidobactérias representam mais de 95% da microbiota intestinal, enquanto que, em adultos, apenas 25% (WANG; GIBSON, 1993). Idosos tendem a apresentar populações ainda menores de bifidobactérias, enquanto que o número de bactérias patogênicas, tais como coliformes, enterobactérias e clostrídios, tende a aumentar (SHAH, 1997).

O recém-nascido desenvolve uma coleção heterogênea de bactérias no trato gastrointestinal, sob a influência de fatores relacionados ao hospedeiro, às bactérias e a outros fatores externos, como o uso de medicamentos, a alimentação e as condições de higiene/contaminação ambiental. Há seleção da microbiota, com persistência de algumas populações bacterianas e eliminação de outras. Os fatores que influenciam a colonização bacteriana do trato gastrointestinal são simultâneos e interagem, de forma que um fator influencia ou altera o efeito do outro. Entre estes podem se citados a contaminação ambiental, a genética, o sistema imune, o aleitamento materno ou artificial, o uso de antibióticos, entre outros (BRANDT *et al.*, 2006).

Na faixa etária pediátrica, especialmente quando se pretende utilizar os probióticos para a prevenção de determinadas doenças, procura-se interferir no momento da instalação da microbiota intestinal do lactente, fazendo com que os mesmos façam parte da microbiota definitiva do hospedeiro (CHEN; WALKER, 2005; KALLIOMAKI *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por Penders *et al.* (2006), através de análises das amostras de fezes de bebês com um mês de idade, por método quantitativo que detecta vários grupos e espécies de bactérias, o *Real Time Polimerase Chain (RT-PCR)*, foi possível verificar que crianças nascidas por cesariana apresentaram menor número de bifidobactérias e *Bacteroides*, considerando que elas fossem mais frequentemente colonizadas por *Clostridium difficile*, comparadas com as crianças nascidas por parto normal. Exclusivamente, bebês alimentados com fórmula foram colonizados mais frequentemente por *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides* e *Lactobacillus*, comparados com bebês amamentados no peito. A hospitalização e a prematuridade foram associadas com a prevalência e com a elevada contagem de *Clostridium difficile*.

O uso de antibióticos por bebês foi associado com a queda do número de bifidobactérias e bacteroides. Os pontos mais relevantes que influenciaram a composição da microbiota intestinal dos lactentes foram o modo do parto, o tipo de alimentação infantil, a idade gestacional, a hospitalização infantil, e a antibioticoterapia usada da pelo recém-nascido. Os bebês nascidos por parto normal, em casa e que foram exclusivamente amamentados no peito, na maioria, pareceram ter microbiota intestinal benéfica, elevados números de bifidobactérias e baixo número de *Clostridium difficile* e *Escherichia coli*.

2.5. *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*

Bifidobacterium é um gênero dominante entre a diversificada microbiota residente no trato gastrointestinal humano (TGI), sendo considerada benéfica para humanos. O trato gastrointestinal de recém-nascidos saudáveis é normalmente colonizado por bifidobactérias, especialmente em crianças amamentadas durante os primeiros dias de vida (BRICZINSKI *et al.*, 2009)

Esses micro-organismos são Gram-positivos, anaeróbicos, em forma de bastonete, não-esporulantes, sem motilidade e não-resistentes a ácido. Atualmente, o gênero *Bifidobacterium* é classificado na família *Actinomycetaceae*, na qual estão presentes trinta espécies (KHEADR *et al.*, 2007).

Bifidobacterium animalis ssp *lactis* HN019, originada de lácteos, foi considerado um probiótico em potencial, baseado em sua capacidade de resistir à bile e a pH bem ácidos *in vitro*. Essa estirpe se apresentou capaz de adesão em quantidade elevada e em diferentes tipos de células de epitélio intestinal (GOPAL *et al.*, 2001).

A microbiota intestinal atua como agente primário no desenvolvimento do sistema imune pós-natal, assim como na tolerância oral e na imunidade. A interação entre os probióticos e os enterócitos é a chave na imunomodulação. Sugere-se que existam diversos mecanismos pelos quais *B. lactis* HN019 exerce seus efeitos benéficos no sistema imune. Um deles estaria diretamente relacionado com a interação entre as células de HN019 e as células do sistema imune intestinal. Essa interação é facilitada

devido à boa adesão de *B. lactis* nas células do epitélio intestinal. O consumo dessa estirpe tende a reduzir o risco de infecções por bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*, *Clostridium spp.* e *Bacteroides* (GOPAL; PRASAD; GILL, 2003).

Fórmulas em pó para bebês ou crianças pequenas contendo probióticos têm sido desenvolvidas e muitos ensaios clínicos destes produtos confirmaram não apenas os efeitos dos probióticos na saúde infantil, mas também a sua segurança. O ensaio clínico duplo-cego, placebo-controle, realizado por Dekker *et al.* (2009), utilizando duas cepas probióticas comerciais (*Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019), teve como objetivo verificar o aspecto de segurança para essas cepas sobre o desenvolvimento de eczema atópico infantil em lactentes com risco elevado de doença alérgica. O estudo consistiu em três tratamentos: um grupo que recebeu doses diárias de *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), outro grupo com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (HN019) e o grupo placebo-controle. Para verificar os efeitos das cepas HN019 e HN001 sobre eczema infantil foi incluída uma série de parâmetros de segurança, que permitiram identificar eventuais impactos negativos decorrentes do tratamento com o probiótico. A análise dos resultados mostrou que o consumo diário de probióticos a partir do nascimento até os dois anos não exerceu efeito sobre crescimento, saúde e tolerância. A prevalência de eventos adversos que resultassem em hospitalização e o uso de antibióticos não diferiram entre os três tratamentos. *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 e *L. rhamnosus* HN001 apresentaram-se seguros e bem tolerados quando administrados em crianças desde o nascimento.

Por outro lado, Kim *et al.* (2010) estudaram a suplementação com probióticos na prevenção do desenvolvimento de eczema em crianças com alto risco de alergia através de ensaio duplo-cego randomizado com placebo. Gestantes (112) com histórico familiar de alergia receberam diariamente a mistura de *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *B. lactis* AD011, *Lactobacillus acidophilus* AD031 ou placebo, 4 a 8 semanas antes do parto e até 6 meses após o mesmo. Os recém-nascidos foram amamentados exclusivamente nos primeiros três meses e subsequentemente alimentados com leite materno ou fórmula láctea do quarto ao sexto mês de vida. Os sintomas clínicos foram acompanhados durante um ano, quando IgE total e específico contra alérgenos alimentares foram medidos. Os autores concluíram que a suplementação com a mistura de probióticos é

uma abordagem efetiva na prevenção de eczema em crianças com alto risco de alergia no primeiro ano de vida.

Atualmente, o emprego dos probióticos é mais promissor na prevenção de diarreias. Embora alguns estudos mostrem melhora do eczema atópico; esses dados exigem confirmação. Assim, mais estudos são necessários para comprovar a eficácia e a segurança dos probióticos na população pediátrica (MORAIS; JACOB, 2006).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis fermentadas ou não, probióticas durante armazenamento a 4 °C.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver formulados infantis contendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, fermentadas ou não, a partir de matrizes lácteas e não lácteas.
- Caracterizar quimicamente as fórmulas infantis probióticas desenvolvidas.
- Estudar a cinética de acidificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em fórmulas infantis lácteas e não lácteas.
- Verificar o efeito do processo (fermentação ou adição) e do tipo de matriz (láctea e não láctea) na viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, o valor de pH e de acidez dos produtos durante o armazenamento a 4° C.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizadas as seguintes matrizes alimentares:

- FPL, fórmula de partida láctea, Nestlé Brasil, Araçatuba – SP, Brasil.
- FSL1, fórmula sequencial láctea 1, Nestlé Brasil, Araçatuba – SP, Brasil.
- FSL2, fórmula sequencial láctea 2, Nestlé Brasil, Araçatuba – SP, Brasil.
- FPNL, fórmula de partida não láctea, Nestlé Infant Nutrition, New Jersey, EUA.
- FSNL1, fórmula sequencial não láctea 1, Globalfood Advanced Food Technology, São Paulo – SP, Brasil.
- FSNL2, fórmula sequencial não láctea 2, Support Produtos Nutricionais Ltda, São Paulo – SP, Brasil.

A cultura probiótica empregada foi *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, Danisco, Madison, EUA.

4.2 Métodos

4.2.1 Planejamento experimental e procedimento experimental

Doze produtos, sendo seis fermentados por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 e seis apenas adicionados da cultura probiótica, foram preparados segundo o planejamento experimental apresentado na Tabela 2. As matrizes foram preparadas em parceria na Planta-Piloto da empresa Globalfood, localizada na cidade de São Paulo-SP, Brasil.

Preparação das matrizes e tratamento térmico

Inicialmente, as matrizes foram reconstituídas de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Antes de serem submetidas ao tratamento térmico, o valor de pH de cada matriz foi mensurado pelo potenciômetro digital (Mod.8603, Mettler-Toledo, Scherzenbach, Suíça) e ajustado acerca de 6.60 com adição de 0,1% de fosfato de sódio, tomando-se o cuidado de não adicionar o volume máximo permitido (0,2%). Em seguida, estas foram pré-aquecidas a 80 °C em trocador de calor a placas ALFA LAVAL (tipo A3 – HBR-Lund, Sweden), homogeneizadas a 200 bar em dois estágios em Homogeneizador TREU, Rio de Janeiro, Brasil, sendo 50 bar no primeiro estágio e 150 bar no segundo estágio de homogeneização, aquecidas a 140 °C em trocador de calor a placas e mantidas nessa temperatura durante quatro segundos, em circuito fechado. Finalmente, as matrizes foram resfriadas até 10 °C, envasadas em sacos laminados e armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Os ensaios realizados na Planta-Piloto da GlobalFoods, São Paulo foram repetidos três vezes, isto é, foram preparados três lotes de maneira independente.

Preparação do inóculo

Para o preparo dos inóculos das matrizes fermentadas, foi feita a adição de 0,9g de HN019, em 50 mL de cada matriz. Visando obter uma contagem inicial acima de $8,30 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$.

Preparação dos formulados probióticos fermentados e não fermentados

Fermentados

Cada matriz tratada termicamente foi transferida para frascos Shott de 500mL e colocada em banho-maria acoplado ao sistema CINAC até se obter a estabilização da temperatura, a 42 °C. Adicionou-se 1mL do inóculo em 500mL da matriz correspondente e procedeu-se à homogeneização.

Cada ensaio foi realizado em duplicata e foi monitorado utilizando o sistema CINAC (Ysebaert, Frépillon, França), descrito por Spinnler E Corrieu (1989), o qual permite a medição contínua e gravação do nível de pH, computando a taxa de acidificação durante o período de fermentação (Figura 1). Quando o pH 4,7 foi atingido, a fermentação foi interrompida e os frascos Shott foram resfriados rapidamente por 15 minutos em banho de gelo. Em seguida, houve a quebra do coágulo através de agitação manual com o auxílio de haste de aço inoxidável com disco perfurado; a haste foi movimentada para cima e para baixo por 60 segundos. Os formulados probióticos fermentados foram dispensados com o auxílio de uma proveta; em condições assépticas; em frascos com tampa tipo veda rosca 100% polietileno tereftalato (PET 60 mL), cor cristal, e estocados sob refrigeração de 4 °C até o momento das análises.

A partir dos dados obtidos, calcularam-se as velocidades de acidificação (dpH/dt), expressas como miliunidades de pH/min ($V_{máx}$). No final do período de incubação foram ainda calculados os seguintes parâmetros cinéticos:

- $t_{máx}$: tempo no qual atinge-se a velocidade máxima.
- $V_{máx}$: velocidade máxima de acidificação.
- pH em $V_{máx}$: pH do leite quando a velocidade máxima foi atingida.
- $t_{pH\ 5,5}$: tempo para atingir o pH 5,5 (h).
- $t_{pH\ 4,7}$: tempo para atingir o pH 4,7 (h).

Não fermentados

Os inóculos dos formulados probióticos não fermentados (50 mL) foram homogeneizados durante 1 minuto e adicionados em 450 mL da matriz correspondente. Após a inoculação, as matrizes foram distribuídas com o auxílio de uma proveta em frascos com tampa tipo veda rosca 100% polietileno tereftalato (PET 60 mL), cor cristal, e armazenadas sob refrigeração de 4 °C. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Tabela 2. Planejamento experimental para estudar a viabilidade de *Bifidobacterium lactis* subsp. *lactis* HN019 em diferentes matrizes alimentares fermentadas ou não durante armazenamento a 4 °C

Ensaio	Matriz	Tecnologia	Sigla	Tempo de armazenamento (Dias)
1	Láctea	Fermentada	FPLF	d ₀ , d ₁ , d ₇ , d ₁₄ , d ₂₁
2	Láctea	Fermentada	FSL1F	d ₀ , d ₁ , d ₇ , d ₁₄ , d ₂₁
3	Láctea	Fermentada	FSL2F	d ₀ , d ₁ , d ₇ , d ₁₄ , d ₂₁
4	Não láctea	Fermentada	FPNLF	d ₀ , d ₁ , d ₇ , d ₁₄ , d ₂₁
5	Não láctea	Fermentada	FSNL1F	d ₀ , d ₁ , d ₇ , d ₁₄ , d ₂₁
6	Não láctea	Fermentada	FSNL2F	d ₀ , d ₁ , d ₇ , d ₁₄ , d ₂₁
7	Láctea	Não Fermentada	FPLNF	d ₀ , d ₁ , d ₃ , d ₇
8	Láctea	Não Fermentada	FSL1NF	d ₀ , d ₁ , d ₃ , d ₇
9	Láctea	Não Fermentada	FSL2NF	d ₀ , d ₁ , d ₃ , d ₇
10	Não láctea	Não Fermentada	FPNLNF	d ₀ , d ₁ , d ₃ , d ₇
11	Não láctea	Não Fermentada	FSNL1NF	d ₀ , d ₁ , d ₃ , d ₇
12	Não láctea	Não Fermentada	FSNL2NF	d ₀ , d ₁ , d ₃ , d ₇

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FPNL2: fórmula de partida não láctea 2; F: fermentada; NF: não fermentada.

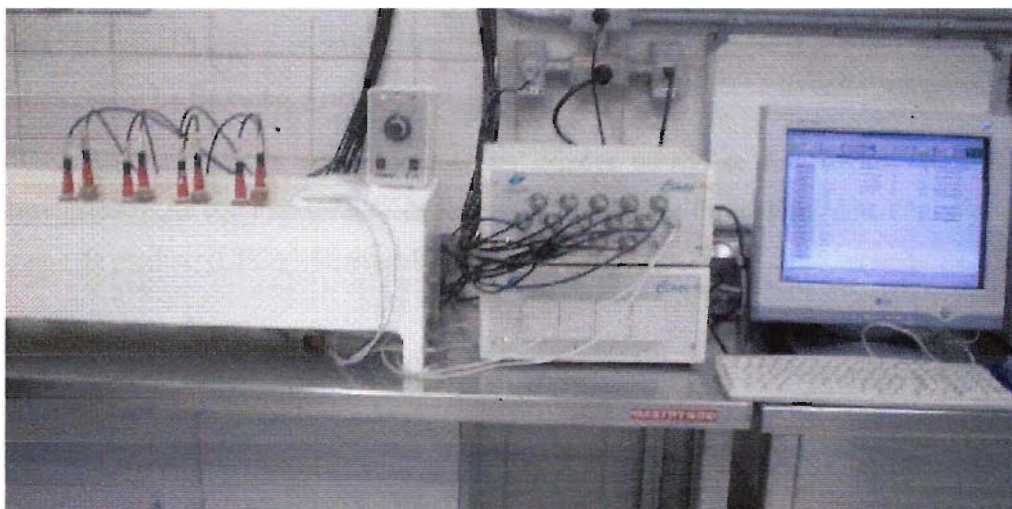


Figura 1. Sistema CINAC (*Cinétique d'acidification*).

Finalmente, foram realizados os seguintes controles dos formulados lácteos e não lácteos fermentados ou não: composição química (sólidos totais, densidade, proteína, gordura, cinzas, extrato seco desengordurado, pH e acidez titulável). Os valores de carboidratos e calorias foram obtidos através de cálculos e da contagem de células viáveis antes da fermentação e após 1, 7, 14, 21 dias, para os formulados probióticos fermentados, e aos 0, 1, 3 e 7 dias, para os formulados probióticos não fermentados.

4.2.2. Contagem de células viáveis

Um mL de cada amostra foi diluído em 9 mL de água peptonada (0,1% p/v), esterilizada e homogeneizada em um agitador de soluções AP56 Phoenix (Araraquara, São Paulo, Brasil). A suspensão foi submetida a diluições seriadas utilizando-se o mesmo diluente e 1 mL da diluição apropriada foi inoculado em meios seletivos.

B. lactis foi enumerado em meio RCA Agar (Oxoid, Basingstoke) com adição de azul de anilina (0,03%) e 100 µL do antibiótico dicloxacilina para cada 100 mL de meio, a fim de se atingir a concentração de 2 µg/mL, ajuste de pH a 7 e incubação em

jarra de anaerobiose por 72h a 37 °C. Utilizou-se o método do Spiral System, Interscience, La Breteche, França.

As condições de anaerobiose foram criadas usando-se AnaeroGen® (Oxoid, Basingstoke). As colônias foram enumeradas e as unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g) foram calculadas.

4.2.3 Análises químicas

Sólidos totais

A determinação da matéria seca foi realizada em estufa com circulação forçada de ar a 100-105 °C, até peso constante, seguindo-se o método recomendado pela AOAC (1995). Os resultados foram expressos em % de sólidos totais.

Determinação de proteína

A proteína bruta foi calculada em função dos teores de nitrogênio total determinado pelo método de microKjeldahl, multiplicado pelo fator 6,38 para matrizes de leite e fator 6,25 para matrizes não lácteas (AOAC, 1995).

Determinação de gordura

A matéria graxa foi determinada pelo método de Gerber, segundo BRASIL (2006).

Cinzas

A fração cinza foi obtida gravimetricamente pela determinação da perda de peso do material a 550 °C, segundo o método preconizado pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

Carboidratos totais (por diferença)

Para determinação dos carboidratos totais foi utilizado o cálculo por diferença [100 g - gramas totais de umidade, proteína, lipídios e cinzas] (USP/ FCF, 1998).

Calorias (energia kcal)

Para determinação da energia total metabolizável, expressa em calorias (kcal), foram considerados os fatores de conversão de Atwater: [(4 x g proteína)+ (4 x g carboidratos (total carboidratos) + (9 x g total lipídios)], (USP/ FCF, 1998).

Densidade

A determinação da densidade dos diferentes formulados foi realizada com amostra a 15 °C por termolactodensímetro de Quevenne (BRASIL, 2006).

Pós-acidificação: pH e Acidez Total Titulável

A pós-acidificação dos produtos foi determinada através da medição de pH utilizando o potenciômetro digital (Mod.8603, Mettler-Toledo, Scherzenbach, Suíça). Para determinação do teor de acidez total titulável foi utilizado o método descrito em BRASIL (2006). As amostras foram tituladas com solução Dornic a 0,1N. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido láctico.

4.2.4 Análises estatísticas

Análise de Variância - *General Linear Model* (GLM) e para comparações múltiplas (ANOVA) usando-se o programa Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA) foram realizadas a fim de confirmar a significância estatística das diferenças dos resultados. Os valores médios foram comparados usando o teste de Tukey, com nível de significância $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química das matrizes lácteas e não lácteas

A caracterização química das matrizes lácteas e não lácteas em base úmida apresentou resultados distintos que podem ser vistos na Tabela 2.

Ao avaliar os teores em sólidos totais, nota-se que a FPL apresentou os menores teores quando comparada às demais matrizes, enquanto a FPNL revelou resultados similares às matrizes sequenciais (lácteas e não lácteas). Dentre as fórmulas sequenciais foi observado que, à exceção da FSNL, que apresentou menor teor de sólidos totais, as demais apresentaram resultados semelhantes. Todas as matrizes apresentaram, em média, teor de sólidos totais semelhantes aos obtidos por Venturoso *et al.* (2007) com produtos de origem láctea.

As matrizes de origem láctea apresentaram valores de densidade superiores às matrizes não lácteas, sendo a FSL2 a que apresentou o maior valor, com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) quando comparadas às demais matrizes de origem láctea e não láctea. As matrizes não lácteas apresentaram os menores valores de densidade, sem diferenças estatísticas entre si ($P \geq 0,05$).

A densidade do leite apresenta valores entre 1,023 e 1,040 g.mL⁻¹. Seu valor é diretamente influenciado pelo conteúdo de gordura e de sólidos não-gordurosos. Sendo assim, o leite com teor de gordura baixo ou nulo, como o leite desnatado, como representado pela fórmula láctea FSL2, apresenta densidade maior. Por outro lado, as demais fórmulas, cujos teores de gordura foram superiores, apresentaram valores de densidade mais baixos, compatíveis com os valores de densidade preconizados por Amiot (1991). Valores de densidade semelhantes aos observados para as matrizes lácteas também foram encontrados por Fanti *et al.* (2008) em produtos convencionais lácteos.

Quanto ao teor proteico, as matrizes de origem láctea apresentaram valores superiores às demais, com exceção da FPL, variando de 1,26 a 3,48 g.100g⁻¹. Os teores de proteína encontrados para FPL estão de acordo com os valores mínimos

estabelecidos pelo Codex Alimentarius (1981) e revisados por Khan (2008) e MacLean Jr. *et al.* (2010). As matrizes FSL1 e FSL2 apresentaram valores superiores de proteína, também por se tratarem de matrizes lácteas sequenciais. Assim como os valores de densidade, a FSL2 apresentou os maiores teores de proteína. As matrizes de origem não láctea apresentaram teor proteico semelhante, não diferindo significativamente ($P \geq 0,05$) entre si, estando de acordo com o estabelecido por Bhatia e Greer (2008). Todos os resultados apresentados para os teores de proteína foram superiores aos obtidos por Weizman e Alsheikh (2006) em fórmulas lácteas comerciais suplementadas com diferentes probióticos.

Os resultados obtidos para teor de gordura revelaram que a matriz láctea FSL1 apresentou teor de gordura superior às demais matrizes e a matriz sequencial láctea FSL2 apresentou-se isenta de gordura em relação às demais matrizes. Assim, à exceção dessa matriz, as demais matrizes de origem láctea apresentaram valores adequados, estando em concordância com o estabelecido pelo Codex Alimentarius (1981), pela Academia Americana de Pediatria (1998) e por Koletzko *et al.* (2005) e Khan (2008). Ao comparar os resultados entre as matrizes não lácteas, notou-se que a matriz FSNL1 sequencial apresentou teor de gordura inferior às demais, com diferenças significativas ($P \leq 0,05$). As demais matrizes não lácteas apresentaram valores de gordura similares aos observados para as matrizes de origem láctea, estando de acordo com o preconizado pela Academia Americana de Pediatria (1998). Pode-se observar que as matrizes FPL, FSL1 e FPNL não diferiram estatisticamente ($P \geq 0,05$) quanto ao teor de gordura.

Ao avaliar os valores de cinzas, pode-se observar que as matrizes lácteas diferiram significativamente entre si ($P \leq 0,05$), sendo que a matriz láctea FPL apresentou valor inferior às matrizes lácteas e não lácteas e a FSL2 apresentou os maiores teores de cinzas. Comparando-se os valores obtidos para as matrizes não lácteas, a fórmula sequencial FSNL2 apresentou valor superior às demais, com diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Não foi possível estabelecer comparações para valores de cinzas com outros estudos, tendo em vista que a literatura não disponibiliza dados semelhantes.

As matrizes lácteas sequenciais não diferiram entre si ($P \geq 0,05$) quando comparados os teores de carboidratos. A FPL apresentou o maior teor de carboidratos

entre as matrizes lácteas. Entretanto, todas apresentaram resultados inferiores aos encontrados para as matrizes não lácteas. Os maiores valores de carboidratos encontrados foram obtidos pelas fórmulas FPNL e FSNL2, com diferenças significativas para a fórmula FSNL1. Todos os valores encontrados para as matrizes lácteas e não lácteas estão de acordo com os recomendados por Codex Alimentarius, (1981), Academia Americana de Pediatria (1998) e Koletzko *et al.* (2005).

Quanto aos valores obtidos para o teor de calorias, pode-se observar que a matriz láctea sequencial FSL1 apresentou valor superior e a matriz láctea sequencial FSL2 apresentou o menor valor em calorias comparado às demais matrizes, visto que foi a matriz com menor teor de gordura. As matrizes lácteas apresentaram diferenças significativas entre si ($P \geq 0,05$). Comportamento semelhante ao observado para o teor de carboidratos foi notado para o valor de calorias para as matrizes não lácteas. FPNL e FSNL2 apresentaram maiores valores de calorias ($P \geq 0,05$), enquanto FSNL1 apresentou o menor valor entre as matrizes não lácteas. Os valores obtidos para o teor de calorias estão de acordo com os estipulados nos rótulos dos produtos comerciais utilizados no estudo.

Tabela 3. Caracterização química* das matrizes lácteas e não lácteas em base úmida

Matrizes	Sólidos Totais (g.100g ⁻¹)	Densidade (g.cm ⁻³)	Proteína (g.100g ⁻¹)	Gordura (g.100g ⁻¹)	Cinzas (g.100g ⁻¹)	Carboidratos (g.100g ⁻³)	Calorias (Kcal 100g ⁻¹)
FPL	11,62 ± 0,05 ^a	1,027 ± 0,000 ^b	1,26 ± 0,01 ^a	2,84 ± 0,02 ^{cd}	0,29 ± 0,00 ^a	8,81 ± 0,06 ^b	51,11 ± 0,17 ^c
FSL1	12,98 ± 0,00 ^d	1,028 ± 0,000 ^b	2,91 ± 0,03 ^c	3,22 ± 0,07 ^d	0,76 ± 0,01 ^d	8,25 ± 0,06 ^a	54,10 ± 0,41 ^d
FSL2	12,78 ± 0,04 ^c	1,036 ± 0,000 ^c	3,48 ± 0,04 ^d	0,00 ± 0,00 ^a	1,05 ± 0,00 ^e	8,25 ± 0,08 ^a	46,92 ± 0,17 ^a
FPNL	12,92 ± 0,04 ^{cd}	1,024 ± 0,001 ^a	1,89 ± 0,01 ^b	2,88 ± 0,04 ^{cd}	0,42 ± 0,00 ^b	10,18 ± 0,05 ^d	52,12 ± 0,14 ^c
FSNL1	12,35 ± 0,00 ^b	1,023 ± 0,000 ^a	1,87 ± 0,02 ^b	0,87 ± 0,00 ^b	0,45 ± 0,00 ^b	9,85 ± 0,02 ^c	48,46 ± 0,02 ^b
FSNL2	12,97 ± 0,01 ^d	1,023 ± 0,000 ^a	1,93 ± 0,02 ^b	2,45 ± 0,00 ^c	0,49 ± 0,00 ^c	10,12 ± 0,01 ^d	52,07 ± 0,06 ^c

*Média (n = 6) ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea;

FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2.

5.2. Perfil cinético de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em matrizes lácteas e não lácteas

O perfil de acidificação de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por *B. animalis* subsp. *lactis* a 42 °C até atingir o pH 4,7 pode ser visto na Figura 2.

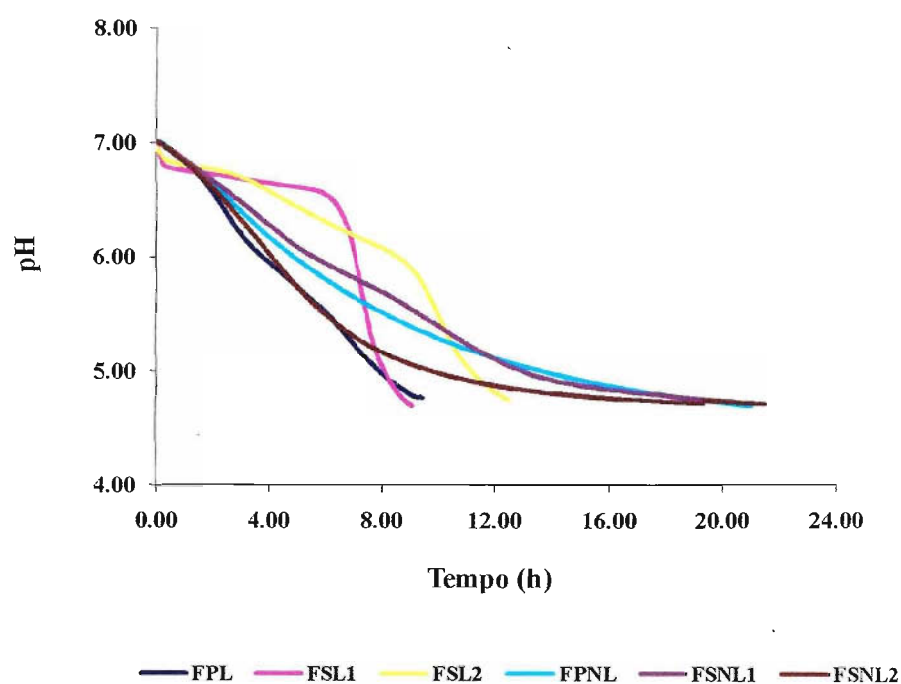


Figura 2. Evolução do pH em função do tempo de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 a 42 °C até o pH 4,7.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2.

Os parâmetros cinéticos de acidificação, bem como o tempo (h) necessário para atingir o pH 4,7, estão mostrados na Tabela 4 e na Figura 2, respectivamente.

A comparação dos parâmetros cinéticos durante a fermentação das seis diferentes matrizes por *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 revelou resultados distintos. O valor de V_{\max} variou entre $6,57 \times 10^{-3}$ e $25,09 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, em matrizes lácteas, e de $4,32 \times 10^{-3}$ e $5,11 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, em matrizes não lácteas (Tabela 4). Observou-se que, nas matrizes não lácteas, os valores de V_{\max} foram significativamente inferiores quando comparados aos obtidos nas matrizes lácteas ($P \leq 0,05$). As maiores velocidades de acidificação entre todas as matrizes estudadas foram obtidas para FSL1 e FSL2, com diferenças significativas entre si e entre as demais matrizes ($P \leq 0,05$). Valores de V_{\max} semelhantes aos obtidos para FSL1 foram observados por Almeida *et al.* (2009) em diferentes bases lácteas. Os valores de $t_{V_{\max}}$ variaram de 2,45 h a 9,93 h, em matrizes lácteas, com diferenças estatísticas significantes entre si ($P \leq 0,05$). Comportamento semelhante foi observado para as matrizes não lácteas. Almeida *et al.* (2009) observaram valores de $t_{V_{\max}}$ inferiores para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em bases lácteas.

O pH para atingir V_{\max} foi superior nas matrizes FPL e FPNL (em média pH 6,46) sem diferenças entre si ($P \geq 0,05$), enquanto FSL1 e FSL2 apresentaram os menores valores de pH (em média 5,64) para atingir V_{\max} ; e FSNL1 e FSNL2 apresentaram comportamento semelhante com valores de pH intermediários.

O tempo necessário para atingir pH 5,5 foi maior para a FSL2, com diferenças significativas perante as demais matrizes de origem láctea e não láctea. Por outro lado, o menor tempo necessário para atingir o pH 5,5 foi observado para FPL e FSNL2. Em relação ao $t_{pH\ 5,0}$, observou-se que as matrizes não lácteas, de modo geral, apresentaram tempo superior para atingir o pH requerido, com diferenças significativas entre si e em relação às matrizes lácteas.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos de acidificação de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 a 42 °C até pH 4,7.

Matriz	V_{\max} (10^{-3} upH.min $^{-1}$)	T_{\max} (h)	pH $_{V_{\max}}$	$t_{\text{pH } 5,5}$ (h)	$t_{\text{pH } 5,0}$ (h)	$t_{\text{pH } 4,7} - t_{\text{pH } 5,5}$ (h)	$t_{\text{pH } 4,7} - t_{\text{pH } 5,0}$ (h)
FPL	6,57 ± 0,10 ^b	2,45 ± 0,00 ^a	6,40 ± 0,02 ^c	6,10 ± 0,05 ^a	7,93 ± 0,05 ^a	3,28 ± 0,03 ^a	1,45 ± 0,05 ^a
FSL1	25,09 ± 0,67 ^d	7,28 ± 0,18 ^{bc}	5,73 ± 0,05 ^{ab}	7,45 ± 0,15 ^{ab}	8,13 ± 0,13 ^a	1,58 ± 0,05 ^a	0,90 ± 0,05 ^a
FSL2	11,60 ± 0,42 ^c	9,93 ± 0,28 ^c	5,54 ± 0,01 ^a	10,00 ± 0,25 ^b	11,18 ± 0,25 ^{bc}	2,50 ± 0,25 ^a	1,33 ± 0,23 ^a
FPNL	4,33 ± 0,07 ^a	2,40 ± 0,40 ^a	6,52 ± 0,07 ^c	8,00 ± 0,25 ^{ab}	13,53 ± 0,28 ^{cd}	12,83 ± 0,03 ^b	7,30 ± 0,05 ^b
FPNL1	4,32 ± 0,06 ^a	7,58 ± 1,93 ^{bc}	5,90 ± 0,11 ^b	9,23 ± 1,40 ^{ab}	14,80 ± 1,50 ^d	11,18 ± 1,33 ^b	5,60 ± 1,25 ^b
FSNL2	5,11 ± 0,06 ^{ab}	4,13 ± 0,23 ^{ab}	5,99 ± 0,01 ^b	5,93 ± 0,23 ^a	9,80 ± 0,50 ^{ab}	14,43 ± 0,88 ^b	10,55 ± 0,60 ^c

V_{\max} : velocidade máxima de acidificação; T_{\max} : tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação; pH $_{V_{\max}}$: pH correspondente a V_{\max} ; $t_{\text{pH } 5,5}$: tempo em h para atingir pH 5,5; $t_{\text{pH } 4,7} - t_{\text{pH } 5,5}$ = diferença entre o tempo final de fermentação e o pH 5,5.

Médias (n = 4) ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FPNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2.

O tempo necessário para atingir o pH 4,7 (Figura 3) variou muito entre as matrizes. A fermentação de *B. lactis* HN019 nas matrizes FPL e FSL1 ocasionou os menores tempos de fermentação ($t_{pH4,7}$), i.e., inferiores a 10h. Por outro lado, a fermentação em FSL2 necessitou de ~13 h para atingir o mesmo valor de pH, com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as matrizes lácteas. Oliveira *et al.* (2009) encontraram valores ligeiramente superiores no tempo de fermentação da cultura pura de *B. animalis* subsp. *lactis* BI04 em leite desnatado. O tempo necessário para que a fermentação de *B. lactis* HN019 nas matrizes não lácteas atingisse o pH 4,7 foi muito superior aos observados nas matrizes lácteas, com tempo final de fermentação acima de 20 h, não diferindo estatisticamente entre si ($P \geq 0,05$)

Esse fato é corroborado pelas diferenças notadas entre a variação de valores do tempo necessário para atingir o pH 4,7, após a matriz ter atingido os pH 5,5 e 5,0. Nas matrizes lácteas, o decaimento do pH a partir do valor 5,5 decorre em no máximo 3,28 h, para FPL. Se avaliado o pH 5,0, essa diferença fica em 1,45 h. Nas matrizes de origem não láctea uma atividade acidificante lenta foi responsável pelo tempo de ~14,50 h do momento em que o pH 5,5 foi atingido até o término da fermentação. Uma das hipóteses relacionadas à baixa atividade acidificante seria a utilização de outros carboidratos mais complexos e/ou ácidos orgânicos pela bifidobactéria nas matrizes não lácteas, caracterizando crescimento lento (SCALABRINI; MATTEUZZI, 1998; PHAM; SHAH, 2008). Segundo Donkor *et al.* (2007), a habilidade de bactérias ácido lácticas em fermentar carboidratos disponíveis no meio de crescimento é dependente do gênero e da espécie. Estes autores ainda destacam que algumas espécies apresentam crescimento lento em produtos à base de soja devido à falta de habilidade em fermentar outros carboidratos.

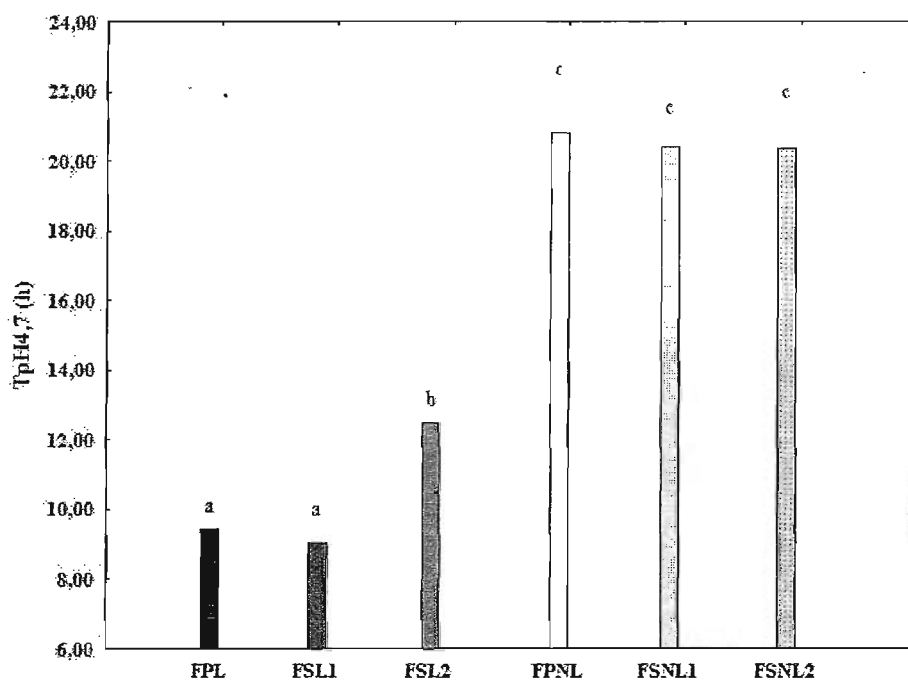


Figura 3. Tempo (h) para atingir pH 4,7 de diferentes matrizes lácteas e não lácteas fermentadas por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 a 42 °C. Médias (n = 2) com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2.

5.3. Contagem de células viáveis em fórmulas infantis fermentadas por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 durante armazenamento a 4 °C

Os inóculos iniciais utilizados nos ensaios continham contagens de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 superiores a $7,30 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$. Antes da fermentação (d0) a contagem média foi de 6,95 a $7,21 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$, apresentando muita similaridade nas três matrizes lácteas estudadas. A contagem de células cultiváveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 fermentadas em matrizes lácteas sob armazenamento por 21 dias a 4 °C está apresentada na Figura 4. A maior contagem foi obtida para o formulado FSL1 após sete dias (d7) de armazenamento a 4 °C, enquanto a menor contagem foi obtida na matriz FPL no momento da inoculação (d0).

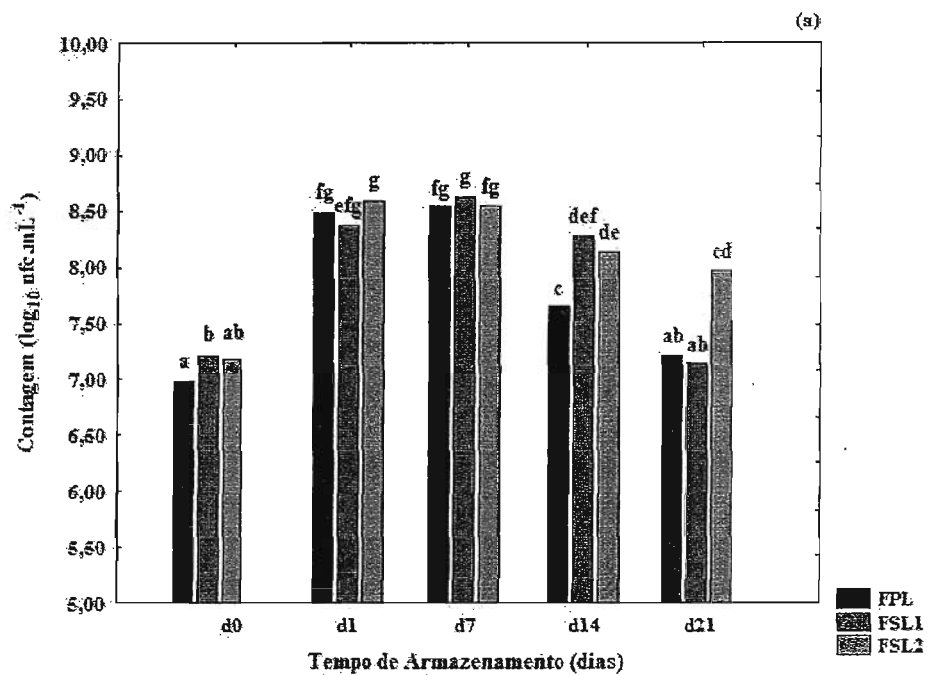


Figura 4. Evolução da contagem de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 em matrizes lácteas fermentadas. Médias (n = 8) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0,05$.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2.

Durante a fermentação, notou-se crescimento de 1,41 \log_{10} ciclos para FPL, FSL1 e FSL2, respectivamente. Após sete dias de armazenamento, as contagens permaneceram estáveis, sem diferenças significativas ($P \geq 0,05$) quando comparadas ao 1º dia de armazenamento. Aos 14 dias de armazenamento, diminuição de 0,84 \log_{10} ciclos para FPL e 0,46 \log_{10} ciclos para FSL2 foi observada. Por outro lado, o formulado FSL1 apresentou o menor decréscimo (0,08 \log_{10} ciclos) na contagem de células cultiváveis. Após o 21º dia de armazenamento, as contagens de todos os formulados de origem láctea apresentaram, em média, decréscimo significativo ($P \leq 0,05$) de 1,05 \log_{10} ciclos. A contagem final obtida após 21 dias de armazenamento refrigerado está de acordo com o preconizado por ANVISA (2007) e Oliveira (2002), para produto probiótico, estando acima de 7,13 \log_{10} UFC. mL⁻¹ nos formulados lácteos fermentados.

Alguns estudos relacionados à sobrevivência de probióticos em fórmulas em pó mostram que existe pouco ou nenhum relato sobre a estabilidade dos probióticos nas fórmulas, especialmente na área comercial, apesar da estabilidade de bifidobactérias em iogurtes, leites fermentados e derivados estar sendo amplamente investigada (VINDEROLA *et al.*, 2000; CHAMPAGNE *et al.*, 2005; PHILIPS *et al.*, 2006; HIGL *et al.*, 2007).

Almeida *et al.* (2001) e Castro *et al.* (2008) obtiveram contagens microbiológicas de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em bebidas lácteas à base de soro de queijo superiores às obtidas nos formulados lácteos fermentados deste estudo após um dia de armazenamento refrigerado. O mesmo comportamento foi observado por Damini *et al.* (2009) em leites fermentados formulados com diferentes suplementos e por Antunes *et al.* (2007 a, b) em um novo produto lácteo fermentado formulado chamado *buttermilk*.

Na Figura 5, apresenta-se a evolução da contagem de células cultiváveis em matrizes não lácteas fermentadas por *B. lactis* (HN019) durante o período de armazenamento de 21 dias, sob refrigeração a 4 °C. A maior contagem (8,78 \log_{10} UFC. mL⁻¹) foi observada para o formulado FPNL após o primeiro dia (d1) de

armazenamento sob refrigeração a 4 °C, enquanto a menor contagem (5,96 log₁₀ UFC. mL⁻¹) foi obtida no formulado FSNL2 no momento da inoculação (d0).

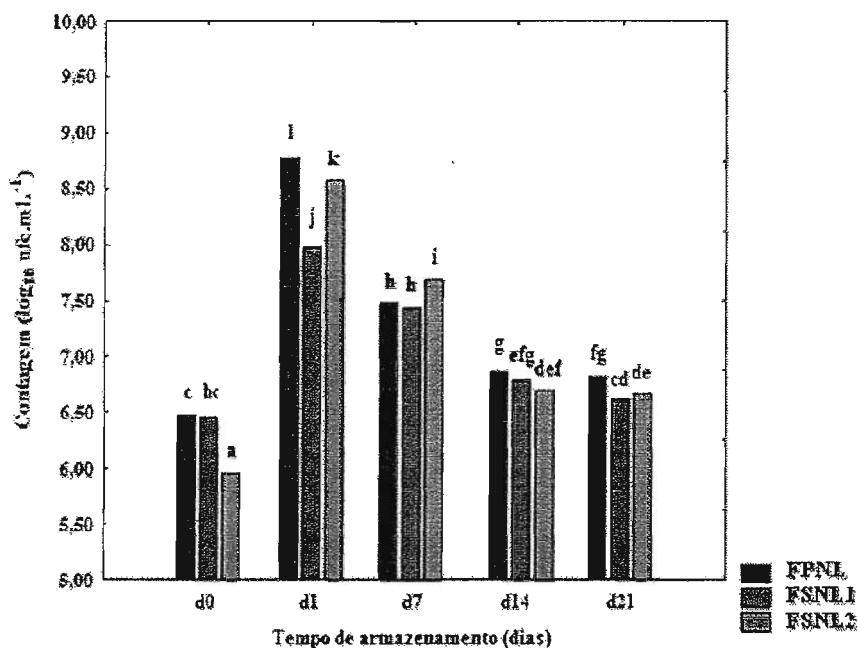


Figura 5. Evolução da contagem de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 fermentadas em matrizes não lácteas. Médias (n = 8) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2.

Durante a fermentação, notou-se crescimento médio de 2,15 log₁₀ ciclos. Após o sétimo dia de armazenamento, houve decréscimo significativo na contagem de células cultiváveis ($P \leq 0,05$) para todos os formulados, com decaimento de 1,30 log₁₀, 0,55 log₁₀ e 0,88 log₁₀ ciclos para FPNL, FSNL1 e FSNL2, respectivamente. Notou-se que do 14º ao 21º dias de armazenamento não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) na contagem microbiológica. Foi observado, em média, decréscimo significativo de 1,74

\log_{10} ciclos para todos os formulados de origem não láctea após os 21 dias de armazenamento.

A contagem final obtida após 21 dias de armazenamento refrigerado está de acordo com o requerido para produto probiótico, segundo o preconizado pela ANVISA (2007), estando acima de $6,61 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ para todos os formulados fermentados não lácteos.

As contagens microbiológicas de *B. lactis* obtidas ao término da fermentação (Figura 5) foram superiores às obtidas por Pham e Shah (2008) para produto lácteo suplementado com proteína isolada de soja e semelhantes às obtidas por Champagne *et al.* (2009), com *B. longum* em formulado fermentado de soja, e por Yeo e Liong (2010), com cepas de bifidobactéria após a fermentação em leite de soja. De maneira análoga, Krüger *et al.* (2008) obtiveram contagens microbiológicas similares de *Bifidobacterium spp.* para bebida láctea probiótica formulada com soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja durante o mesmo período de armazenamento.

5.4. Contagem de células viáveis em matrizes lácteas e não lácteas adicionadas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 durante armazenamento a 4 °C

Na Figura 6, apresenta-se a evolução da contagem de células cultiváveis em formulados lácteas adicionados de *B. lactis* (HN019) durante o período de armazenamento de sete dias, sob refrigeração a 4°C. No momento da inoculação, i.e, d0, a contagem de células viáveis foi em média de 8,53 log₁₀ UFC. mL⁻¹. A maior contagem (8,67 log₁₀ UFC. mL⁻¹) foi observada para o formulado FSL1 após três dias de armazenamento sob refrigeração.

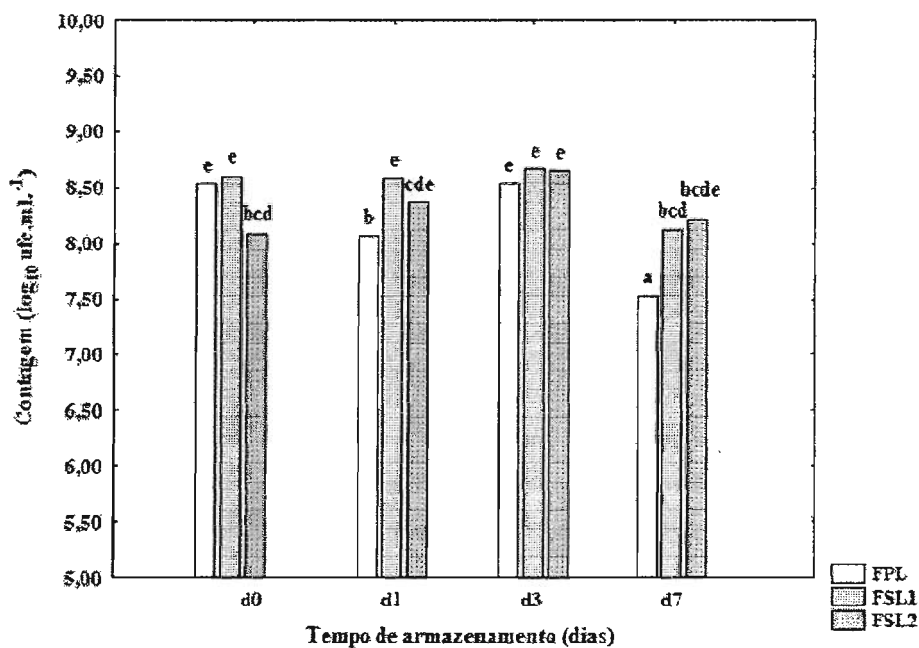


Figura 6. Evolução da contagem de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 adicionadas em matrizes lácteas. Médias (n = 8) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2.

Avaliando os resultados pode-se observar que *B. lactis* no formulado probiótico lácteo FSL2 apresentou crescimento de 0,91 log₁₀ ciclos durante a fermentação, que continuou após o 1º até o 3º dia de armazenamento do produto sob refrigeração. Este comportamento do probiótico diferiu nas demais matrizes ($P \geq 0,05$), i.e., a contagem permaneceu estável ou mesmo diminuiu de 0,55 log₁₀ e 0,47 log₁₀ ciclos para FPL e FSL1, respectivamente. A contagem final acima de 7,53 log₁₀ UFC. mL⁻¹ obtida após sete dias de armazenamento refrigerado de todos os produtos está de acordo com o requerido pela ANVISA (2007).

Poucos dados relacionados à viabilidade de probióticos em fórmulas infantis estão disponíveis na literatura, devido ao grande desafio tecnológico de manter o micro-organismo probiótico estável durante o período de armazenamento nos produtos em pó (ABE *et al.*, 2009).

Abe e colaboradores (2009) compararam a estabilidade de *Bifidobacterium spp.* em fórmulas comerciais em pó e testes nas quais *B. longum* (BB536), *B. breve* (M-16V) e *B. infantis* (M-63) foram adicionados, durante o período de validade de 24 meses, observando contagens significativamente superiores nas fórmulas comerciais, mantendo contagem de células viáveis acima de 6,00 log₁₀ UFC.mL⁻¹.

A estabilidade dos micro-organismos é essencial para que o efeito probiótico seja alcançado. Assim, Mah *et al.* (2007) realizaram um estudo clínico com crianças asiáticas, ministrando 60 mL de fórmulas de partida láctea adicionadas de 7,00 log₁₀ UFC.g⁻¹ de *B. longum* BB536. O micro-organismo permaneceu viável durante 600 dias, de acordo com o laudo do fabricante; entretanto, a estabilidade durante o período de estudo não foi testada.

Na Figura 7, apresenta-se a evolução da contagem de células cultiváveis em formulados não lácteos adicionados de *B. lactis* (HN019) durante o período de armazenamento de sete dias, sob refrigeração a 4 °C. As contagens variaram 7,43 log₁₀ UFC. mL⁻¹ (FSNL2, d7) a 8,75 log₁₀ UFC. mL⁻¹ (FSNL1, d0).

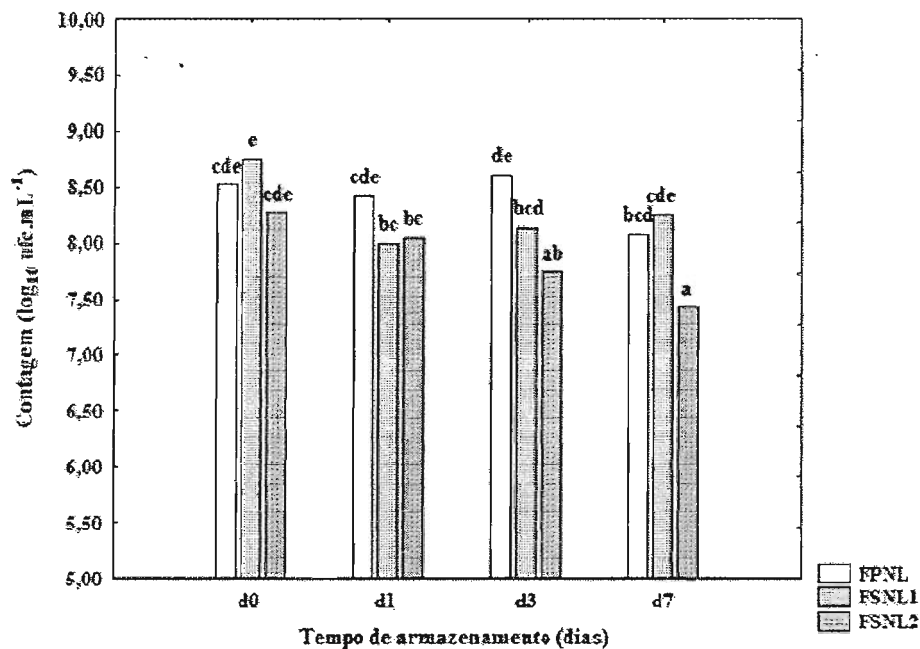


Figura 7. Evolução da contagem de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 adicionadas em matrizes não lácteas. Médias (n = 8) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2.

Avaliando os resultados obtidos, observou-se que todos os formulados atingiram contagem de *B. lactis* HN019 suficientes para considerá-los alimentos funcionais, após o 3º dia de armazenamento sob refrigeração, com exceção do formulado FSNL2, que apresentou decréscimo significativo de 0,30 log₁₀ e 0,61 log₁₀ ciclos após 3 e 7 dias de armazenamento ($P \leq 0,05$). A contagem de células viáveis no formulado FPNL, nos primeiros dias de armazenamento, manteve-se com valor exigido para considerá-lo alimento funcional, apresentando decréscimo de 0,34 log₁₀ ciclos ao término do período de armazenamento.

Não foi observado decréscimo significativo ($P \geq 0,05$) para todos os formulados de origem não láctea após os 7 dias de armazenamento a 4 °C. A contagem final obtida

após 7 dias de armazenamento refrigerado está de acordo com as normas da ANVISA (2007) para produto probiótico, estando acima de $7,43 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$.

Não foi possível estabelecer comparações da contagem de micro-organismos probióticos adicionados a matrizes não lácteas com outros estudos, tendo em vista que a literatura não disponibiliza dados semelhantes.

5.5. Evolução do valor pH e de acidez de formulados probióticos lácteos e não lácteos fermentados por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 durante armazenamento a 4 °C

A pós-acidificação, representada pelos valores de pH e pela acidez, determinada em g de ácido láctico, dos formulados probióticos fermentados lácteos e não lácteos durante o período de armazenamento a 4 °C, pode ser observada nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

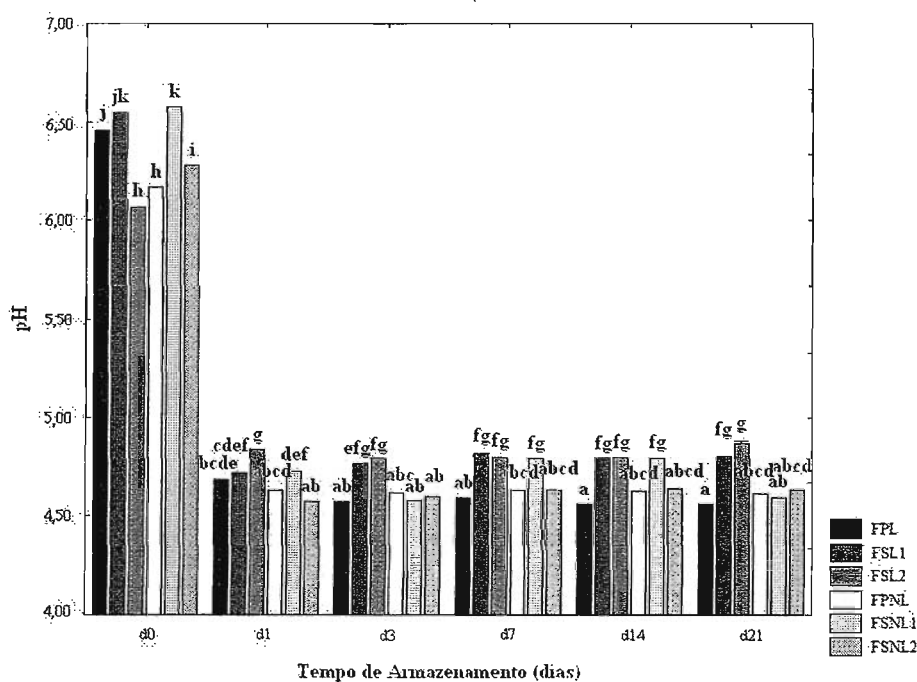


Figura 8. Evolução do valor de pH de fórmulas infantis probióticas antes (d0) e aos um (d1), três (d3), sete (d7), 14 (d14) e 21 (d21) dias após a fermentação por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019. Médias (n = 3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2

Os valores de pH não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os formulados probióticos lácteos fermentados por *B. lactis* HN019, durante o período de 21 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C. Notou-se, inclusive, sutil aumento do pH no formulado FPL. Os resultados obtidos demonstraram decréscimo médio de 0,16 unidades de pH nos formulados probióticos lácteos fermentados, ao final de 21 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C ($P \geq 0,05$). Esses resultados contribuíram para manutenção e estabilidade do produto e na contagem microbiana adequada dos formulados probióticos fermentados, visto que o micro-organismo empregado neste estudo apresenta sensibilidade a elevados valores de acidez e de pH baixos.

Observou-se que todos os formulados probióticos fermentados lácteos apresentaram valores de pH similares aos obtidos por Almeida *et al.* (2007) em leite desnatado e soro de leite, fermentados por micro-organismos probióticos em culturas binárias. Foi igualmente relatado nesse estudo, ao empregar a cultura *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (B104), que menor pós-acidificação era notada para bebidas lácteas fermentadas. Oliveira *et al.* (2009) realizaram estudo com leites fermentados por co-culturas e culturas probióticas puras, suplementados ou não com diferentes concentrações de inulina, e relataram ligeiro decréscimo dos valores de pH para todos os produtos lácteos durante o armazenamento refrigerado.

Em relação aos formulados probióticos não lácteos fermentados por *B. lactis* HN019, os valores de pH não apresentaram diferenças estatísticas entre si durante o período de 21 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C. Lin *et.al.* (2004) desenvolveram bebidas fermentadas com diferentes proporções de *Lactobacilos paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 e *Bifidobacterium longum*, produzidas com uma combinação de leite, extrato hidrossolúvel de soja e diferentes amostras de suco (*L. Miller*), e relataram valores de pH e acidez similares aos encontrados neste estudo, durante 14 dias de armazenamento. Relataram, ainda, similaridade aos valores de pH e acidez, indicando que, apesar da diferença no número de células viáveis, o pH e a acidez titulável de todas as bebidas eram muito semelhantes. Donkor *et al.* (2007)

descreveram valores de pH similares em extrato hidrossolúvel de soja fermentado por *Bifidobacterium lactis* (LAFTI B94) após 48 horas de fermentação.

Ao avaliar os valores obtidos pós-acidificação dos formulados probióticos fermentados, mensurados em ácido láctico (Figura 9), notou-se que os formulados lácteos apresentaram valores superiores ($P \leq 0,05$) aos não lácteos durante o período de armazenamento sob refrigeração. Porém, o nível de acidez encontrado para todos os formulados probióticos fermentados mostrou aumento significativo do momento da inoculação (D0) até o período de 24 horas após a fermentação, com exceção do formulado FPL. Após um dia de armazenamento, notou-se que os valores de ácido láctico não aumentaram significativamente ($P \geq 0,05$) nos formulados probióticos fermentados até o último dia de armazenamento (d21) sob refrigeração. Dentre os formulados probióticos lácteos, FPL apresentou valores de ácido láctico (50%) inferiores aos obtidos para os demais. Por outro lado, comparando os valores de ácido láctico entre os formulados probióticos fermentados não lácteos, notou-se que FSNL1 apresentou valores inferiores aos demais, durante o período de armazenamento sob refrigeração, assemelhando-se ao formulado probiótico fermentado lácteo FPL.

Os resultados de pH e acidez obtidos foram adequados para a manutenção da estabilidade do produto, visto que o micro-organismo empregado neste estudo apresenta elevada sensibilidade à acidez.

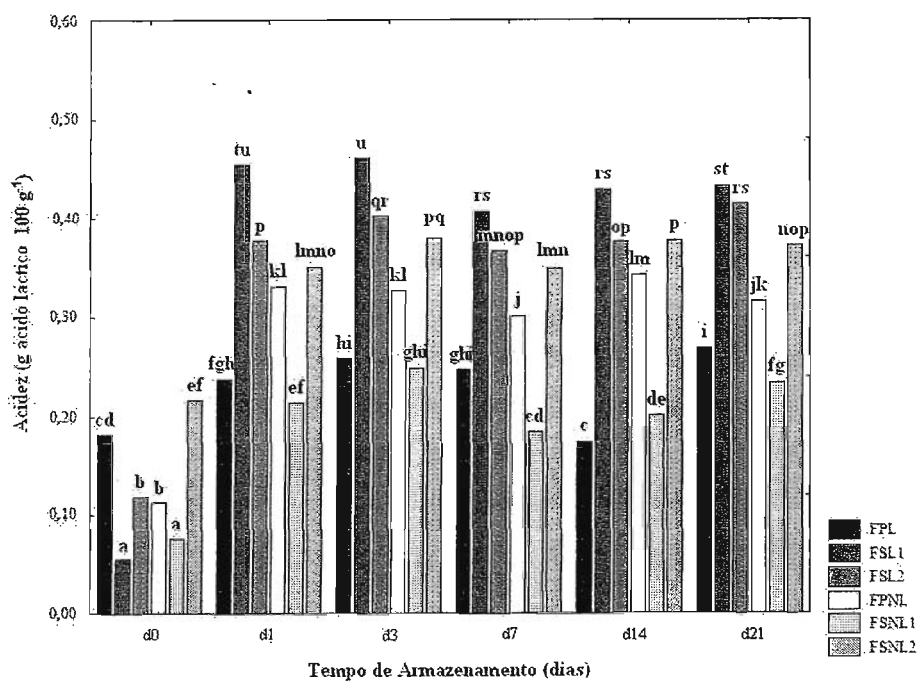


Figura 9. Evolução da acidez (ácido láctico) de fórmulas infantis probióticas antes (d0) e aos um (d1), três (d3), sete (d7), 14 (d14) e 21 (d21) dias após a fermentação por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019. Médias (n = 3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2

5.6. Evolução do valor de pH e da acidez de formulados probióticos lácteos e não lácteos adicionados de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 durante armazenamento a 4 °C

As Figuras 10 e 11 mostram, respectivamente, os resultados de pós-acidificação (pH e acidez) dos formulados probióticos não fermentados lácteos e não lácteos durante o período de armazenamento a 4 °C.

Os formulados de origem não láctea apresentaram valores de pH significativamente inferiores (pH médio= 5,86 upH) aos observados nos formulados de origem láctea (pH médio= 6,14 upH), à exceção do formulado lácteo FPL, cujos valores determinados após 7 dias de armazenamento foram semelhantes aos obtidos pelos formulados não lácteos. Contudo, notou-se que o formulado não lácteo FSNL1 apresentou decaimento médio de 1,02 upH ($P \leq 0,05$) ao final do período de armazenamento.

Ao avaliar os valores obtidos da pós-acidificação dos formulados probióticos não fermentados, mensurados em ácido láctico, notou-se que os valores de pH dos formulados lácteos comparados aos não lácteos mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento sob refrigeração. Dentre os formulados lácteos, FPL foi o que apresentou o menor valor de ácido láctico.

Quando comparados os valores obtidos nos formulados não lácteos, notou-se que os mesmos apresentaram teor de ácido láctico semelhantes durante o período de armazenamento sob refrigeração, embora o formulado FSNL2 tenha apresentado valores de ácido láctico ligeiramente superiores.

Tendo em vista que a pós-acidificação excessiva dos produtos prejudica a sobrevivência dos micro-organismos probióticos (OLIVEIRA; PEREGO *et al.*, 2009), os dados obtidos mostram que os formulados lácteos adicionados, no final do período de armazenamento, apresentaram valores de pH mais elevados, o que pode favorecer a contagem microbiológica mais elevada.

Algumas pesquisas relacionadas à adição de probióticos estudam a viabilidade do micro-organismo durante o período de armazenamento, em fórmulas em pó (ABE *et al.*, 2009). Entretanto, não existem dados disponíveis na literatura que demonstrem a acidificação de fórmulas lácteas e não lácteas adicionadas de *B. lactis* HN019.

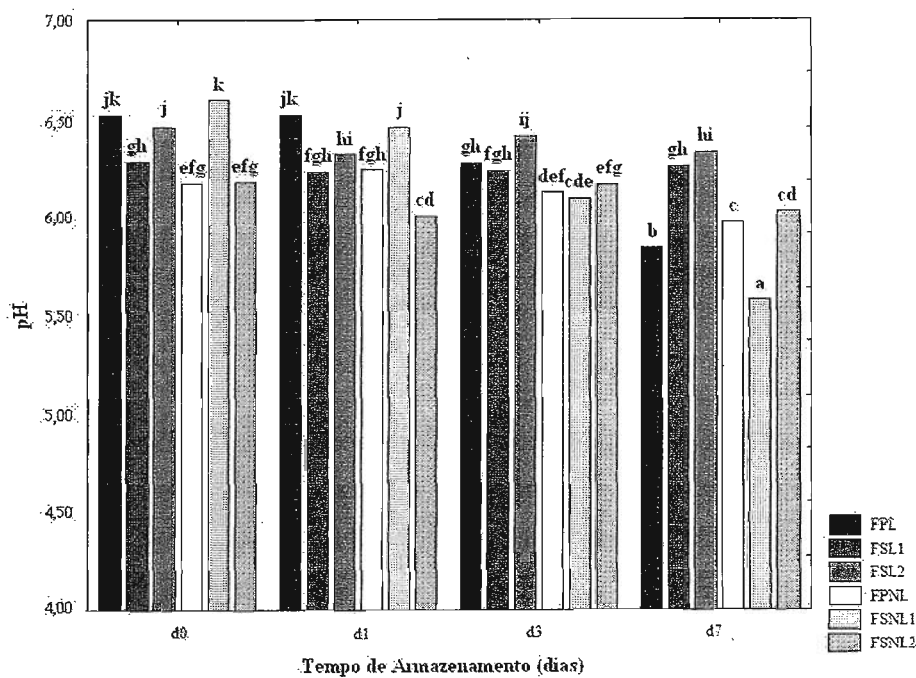


Figura 10. Evolução do valor de pH de fórmulas infantis probióticas antes (d0) e aos um (d1), três (d3) e sete (d7) dias após a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019. Médias (n = 3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2

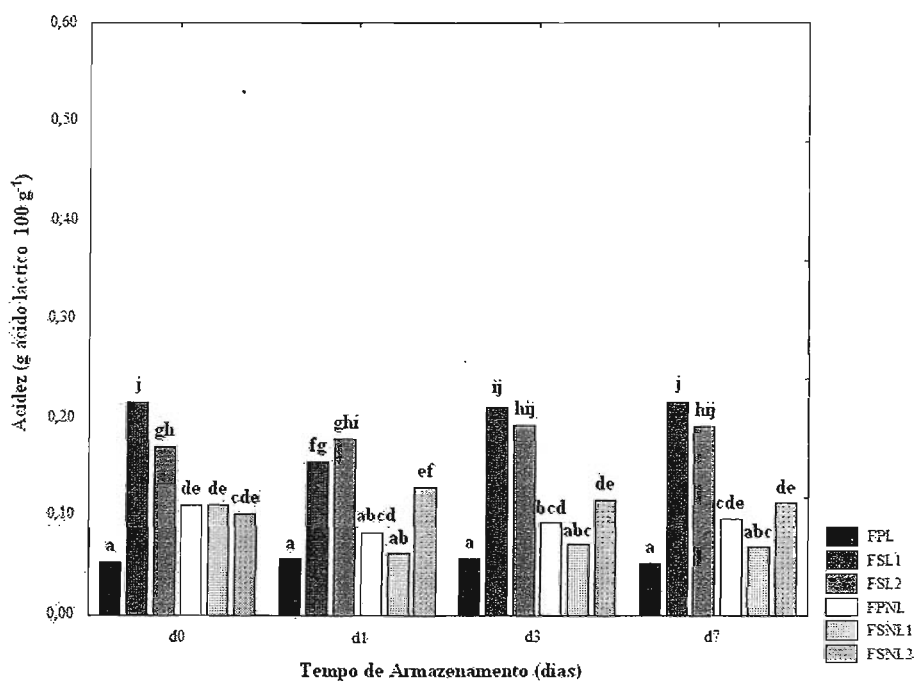


Figura 11. Evolução da acidez (ácido láctico) de fórmulas infantis probióticas antes (d0) e aos um (d1), três (d3) e sete (d7) dias após a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019. Médias (n = 3) com letras diferentes são significativamente diferentes; $P \leq 0.05$.

FPL: fórmula de partida láctea; FSL1: fórmula sequencial láctea 1; FSL2: fórmula sequencial láctea 2; FPNL: fórmula de partida não láctea; FSNL1: fórmula sequencial não láctea 1; FSNL2: fórmula de partida não láctea 2

6. CONCLUSÕES

A caracterização química das matrizes lácteas e não lácteas apresentou resultados distintos. Todos os valores estão de acordo com o descrito no rótulo dos produtos. As matrizes estão de acordo com o preconizado pelo Codex Alimentarius, AAP e ESPGAN, com exceção da FSL2.

A cinética de acidificação de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 diferiu segundo as matrizes empregadas.

As contagens de bactérias cultiváveis nos formulados fermentados e adicionados encontraram-se de acordo com as recomendações da ANVISA.

Os valores de pH e a acidez das fórmulas infantis probióticas fermentadas e adicionadas mantiveram-se estáveis durante o armazenamento. A acidez das fórmulas lácteas fermentadas foi superior a das não lácteas e as fórmulas infantis não lácteas adicionadas apresentaram valores de pH inferiores aos obtidos nas lácteas.

O processo (fermentação ou adição) e o tipo de matriz (láctea e não láctea) influenciaram a pós-acidificação e a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 e produtos durante o armazenamento a 4 °C.

As fórmulas para lactentes podem ser considerados bons veículos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; MIYAUCHI, H.; UCHIJIMA, A.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. Stability of bifidobacteria in powdered formula. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.718–724, 2009.

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 propriedades funcionais aprovadas. 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 13 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.29, de 13 de janeiro de 1998**. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de Alimentos para Fins Especiais. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_98.htm. Acesso em: 05 fev. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.398, 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. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11297&word>. Acesso em: 30 jun. 2008.

AGGETT, P.J.; AGOSTINI, C.; GOULET, O.; HERNELL, O.; KOLETZKO, B.; LAFEVER, H.L.; MICHAELSEN, K.F.; RIGO, J.; WEAVER, L.T. The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.32, n.3, p.256–258, 2001.

AGOSTONI, C.; HASCHKE, F. Infant formulas: recent developments and new issues. **Minerva Pediatrica**, v.55, n.3, p.181-194, 2003.

ÁGUIAR, C.L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.20, n.2, p.323-334, 2002.

ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.187-192, 2001.

ALMEIDA, K.E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.2, p.311–316, 2007.

ALMEIDA, K.E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.672-678, 2009.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Nutrition,. Soy-protein formulas: recommendations for use in infant feeding. **Pediatrics**, v.72, p.359-363, 1983.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Nutrition. Commentary on breast-feeding and infant formula, including proposed standards for formulas. **Pediatrics**, v.57, n.2, p.278-285, 1976.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Nutrition Pediatrics. Soy Protein-based Formulas: Recommendations for Use in Infant Feeding. **Pediatrics**, vol. 101, n.1 jan, 1998.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche: principios y aplicaciones**. Zaragoza: Acibia, 1991. p.1-30.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v.35, p.171-176, 2002.

ANTUNES, A.E.C.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; DOURADO, F.M.; RODRIGUES, L.G.; LERAYER, A.L.S. Development of a probiotic buttermilk. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.83-90, 2007a.

ANTUNES, A.E.C.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; RODRIGUES, L.G.; DOURADO, F.M.; SACCARO, D.M.; LERAYER, A.L.S. Selective enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a new fermented milk product. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.173-177, 2007b.

ANTUNES, A.E.C.; PACHECO, M.T.B., Eds. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, p.9, 2009.

ANTUNES, A.E.C.; SILVA, E.R.A.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; LERAYER, A.L.S. Probiotics: health promoting agents. **Nutrire**, v.32, n.3, p.103-122, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. cap.4.2, p.5.

BADARÓ, A.C.L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V.; STRINGHETA, P.C. Alimentos probióticos: aplicações como promotoras da saúde humana Parte I. **Nutrir Gerais: Revista Digital de Nutrição**, v.2, n.3, p.1-29, 2008. Disponível em: http://www.unilestemg.br/nutrirgerais/downloads/artigos/volume3/artigo_5_rng_alimentos_probioticos.pdf. Acesso em: 24 fev. 2010.

BHATIA, J.; GREER, F. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. **Pediatrics**, v.121, n.5, p.1062-1068, 2008.

BJÖRKSTÉN, B.; SEPP, E.; JULGE, K.; VOOR, T.; MIKELSAAR, M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.108, n.4, p.516-520, 2001.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C.; MIUKI, C.J. Importance of the intestinal microflora: reviews and essays. **Pediatria**, v.28, p.117-127, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. Sislegis. **Instrução Normativa SDA n.68, 12 de dezembro de 2006**. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>. Acesso em: 3 mar. 2010.

BRICZINKI, E.P.; LOQUASTO, J.R.; BARRANGOU, R.; DUDLEY, E.G.; ROBERTS, A.M.; ROBERTS, R.F. Strain-specific genotyping of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* by using single-nucleotide polymorphisms, insertions, and deletions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.23, p.7501-7508, 2009.

CAMPOS, L.A.; FEITOSA, A.R.X.; PINHO, L.G.M.; MELO, M.C.A. Infant formulas: effect on the quality of infant nutrition and health. **Revista de Pediatria**, v.9, n.2, p.59-63, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45, 61-84, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; GREEN-JOHNSON, J.; RAYMOND, Y.; BARRETTE, J.; BUCKLEY, N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**, v.42, p.612-621, 2009.

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

CODEX Alimentarius. **Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants - stan 72 - 1981**. p.1-21. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do>. Acesso em: 22 out. 2008.

COLLINGNON, A.; BUTEL, M.J. Établissement et composition de la flore microbienne intestinale. In: RAMBAUD, J.C.; BUTS, J.P.; CORTIER, G.; FLOURIE, B., eds. **Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives**. Montrouge: John Libbey, 2004. p.19-35.

COLLINS, M.D.; GIBSON G.R. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.1052S-7S, 1999.

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, v.591, p.276-289, 2005.

CUNHA, T.M.; CASTRO, F.P.; BARRETO, P.L.M.; BENEDET, H.D.; PRUDÊNCIO, E.S. Physico-chemical, microbiological and rheological evaluation of dairy beverage and fermented milk added of probiotics. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.103-116, 2008.

DALL'AGNOL, A.; HIRAKURI, M.H. **Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja**. In: Embrapa Soja. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/soja_no_brasil2008.pdf. Acesso em: 23 out. 2008.

DAMIN, M.R.; ALCÂNTARA, M.R.; NUNES, A.P.; OLIVEIRA, M.N. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.10, p.1744-1750, 2009.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1529-1536, 1996.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIER, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.421-429, 2001.

DEKKER, J.W.; WICKENS, K.; BLACK, P.N.; STANLEY, T.V.; MITCHELL, E.A.; FITZHARRIS, P.; TANNOCK, G.W.; PURDIE, G.; CRANE, J. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0-2 years. **International Dairy Journal**, v.19, p.149-154, 2009.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, SHAH, T.N.P.. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. **Food Chemistry**, v.104, p.10-20, 2007b.

DONKOR, O.N.; NILMINI, S.L.I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in ssttype yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.17, p.657-665, 2007a.

FANTI, M.G.N.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M.; SILVA, R.C.; FLORENCE, A.C.R.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Contribution to the study of physicochemical characteristics and lipid fraction of organic milk. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.28, suppl., p.259-265, 2008.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.-P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174–181, 2007.

FAVARO TRINDADE, C.S.; TEREZI, S.C.; TRUGO, L.C.; DELLA MODESTA, R.C.; COURI, S. Development and sensory evolution of soymilk based yoghurt. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.51, p.100-104, 2001.

FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: _____. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: UFV, 2003. p.7-33.

FOMON, J.S. Infant feeding in the 20th century: formula an beikost. **Journal of Nutrition**, v.131, p.S409-S420, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London: FAO/WHO, 2002. 11p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2009.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.1, p.S39–S49, 2002.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R., ed. **Probiotics: the scientific basis**. Local: London: Chapman & Hall, p.1-8, 1992.

FU-MEI LIN.; CHIU-HSIA CHIN.; TZU-MING PAN. Fermentation of a milk–soymilk and *Lycium chinense* Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 and *Bifidobacterium longum*. **Journal Ind Microbiol Biotechnol**, v.31, p.559–564, 2004.

FUMIAKI, A.; HIROFUMI, M.; AYAKO, U.; TOMOKO, Y.; KEIJI, I. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p.234-239, 2009.

GNÄDIG, S.; XUE, Y.; BERDEAUX, O.; CHARDIGNY, J.M.; SEBEDIO, J.L. Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional ingredient. In: MATTILA-SANDHOLM, T., SAARELA, M., eds. **Functional dairy products**. Boca Raton: CRC: Cambridge: Woodhead, 2003. v.1, cap.11, p.263-268. (Woodhead publishing in food science and technology).

- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, p.203-207, 1998.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical and therapeutically properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.139-157, 1999.
- GONÇALVES, A.A.; EBERLE, I.R. Bactérias bífidas: o impacto na indústria de laticínios. **Leite e Derivados**, v.18, n.114, p.34-41, 2009.
- GOPAL, P.K; PRASAD, J.; GILL, H.S. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**, v.23, p.1313-1328, 2003.
- GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHET, S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.23, n.8, p.1077-1086, 2006.
- HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.374-379, 2001.
- HIGL, B.; KURTMANN, L.; CARLSEN, C.U.; RATJEN, J.; FÖERST, P.; SKIBSTED, L.H.; KULOZIK, U.; RISBO, J. Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. **Biotechnology Progress**, v.23, n.4, p.784-800, 2007.
- HOIER, E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. **Food Australia**, v.44, p.418-420, 1992.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; VELD, J.H.J.H. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.85-101, 1998.
- HUDAULT, S.; LIÉVIN, V.; BERNET-CAMARD, M.F.; SERVIN, A. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.2, p.513-518, 1997.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, v.1, p.533, 1985.
- JOECKEL, R.J.; PHILLIPS, S.K. Overview of infant and pediatric formulas: invited review. **Nutrition in Clinical Practice**, v.24, n.3, p.356-362, 2009.

JOHANSSON, S.G.O.; HOURIHANE, J.O.B.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; HAAHTELA, T.; KOWALSKI, M.L.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, v.56, p.813–824, 2001.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, v.26, p.340-352, 2005.

KALLIOMAKI, M.; SALMINEM, S.; ARVILOMMI, H. Probiotics in the primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, v.357, p.1076-9, 2001.

KHAN, M.A. Nutritional adequacy of commercial infant milk formulas. *Ecology of Food and Nutrition*, v.47, p.188–204, 2008.

KHEADR, E.; DABOUR, N.; LAY, C.; LACROIX, C.; FLISS, I. Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as affect by oxgall, acid and hydrogen peroxide stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, n.1, p.169-174, 2007.

KIM, H.S.; KAMARA, B.J.; GOOD, I.C.; ENDERS Jr., G.L. Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, v.3, p.253-257, 1988.

KIM, J.Y.; KWON, J.H.; AHN, S.H.; LEE, S.I.; HAN, Y.S.; CHOI, Y.O.; LEE, S.Y.; AHN, K.M.; JI, G.E. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatric Allergy Immunology*, v.21, p.e386–e393, 2010.

KOLETZKO, B.; BAKER, S.; CLEGHORN, G.; FAGUNDES NETO, U.; GÓPALAN, S.; HERNELL, O.; HOCK, Q.S.; JIRAPINYO, P.; LONNERDAL, B.; PENCHARZ, P.; PZYREMBEL, H.; RAMIREZ-MAYANS, J.; SHAMIR, R.; TURCK, D.; YAMASHIRO, Y.; ZONG-YI, D. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.41, n.5, p.584-599, 2005.

KRÜGER, R.; KEMPKA, A.P.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R.L.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.D. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. *Alimentos e Nutrição*, v.19, n.1, p.43-53, 2008.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, M.P. Adherence of probiotic bacteria to human colonic cells. *Bioscience Microflora*, v.17, p.105-113, 1998.

LARKIN, T.; PRICE, W.E.; ASTHEIMER, L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.6, p.538-552, 2008.

LASEKAN, J.B.; OSTROM, K.M.; JACOBS, J.R.; BLATTER, M.M.; NDIFE, L.; GOOCH, W.M.; CHO, S. Growth of newborn, term infants fed soy formulas for 1 year. **Clinical Pediatrics**, v.38, p.563-71, 1999.

LEAHY, S.S.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.6, p.1303-1315, 2005.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.2, p.67-78, 2004.

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

LIN, F.-M.; CHIN, C.-H.; PAN, T.-M. Fermentation of a milk-soymilk and *Lycium chinense* Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 and *Bifidobacterium longum*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.31, n.12, p.559-564, 2004.

LJUNGH, A.S.A.; WADSTRÖM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.7, p.73-90, 2006.

LORENTE, B.F.; MIÑANA, I.V.; SERRA, J.D. Indicaciones para las fórmulas lácteas especiales: fórmulas para problemas «menores», fórmulas sin lactosa y fórmulas de proteína de soja. **Acta Pediátrica Española**, v.67, n.7, p.333-337, 2009.

LUGONJA, N.M.; MARTINOV, O.B.; RASOVIC, M.R.; SPASIC, S.D.; GOJGIC, D.D.; VRVIC, M.M. A comparative investigation of an in vitro and clinical test of the bifidogenic effect of an infant formula. **Journal of Clinical and Biochemistry Nutrition**, v.47, n.11, p. 208-216, 2010.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.E. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.5, p.1035S-1045S, 1999.

MACLEAN Jr., W.C.; VAN DAEL, P.; CLEMENS, R.; DAVIES, J.; UNDERWOOD, E.; O'RISKY, L.; ROONEY, D.; SCHRIJVER, J. Upper levels of nutrients in infant formulas: comparison of analytical data with the revised Codex infant formula standard. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, n.1, p.44-53, 2010.

MADUKO, C. O. C.; AKOH, C.; PARK, Y. W. Enzymatic Interesterification of Tripalmitin with Vegetable Oil Blends for Formulation of Caprine Milk Infant Formula Analogs. *Journal of Dairy Science*, vol.90, n.2, 2007.

MAGNE, F.; HACHELAF, W.; SUAOU, A.; BOUDRAA, G.; MANGIN, I.; TOUHAMI, M.; BOUZIANE-NEDJADI, K.; POCHART, P. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, v.58, n.3, p.563–571, 2006.

MAH, K.W.; CHIN, V.L.L.; WONG, W.S.; LAY, C.; TANNOCK, G.W.; SHEK, L.P.; AW, M.M.; CHUA, K.Y.; WONG, H.B.; PANCHALINGHAM, A.; LEE, B.W. Effect of a milk formula containing probiotics on the fecal microbiota of Asian infants at risk of atopic diseases. *Pediatric Research*, v.62, n.6, p.674–679, 2007.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MATTO, J.; SAARELLA, M. Lactic acid bacteria with health claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, v.9, p.25-35, 1998.

MEGRAUD, F.; BOUDRAA, G.; BESSAOUD, K.; BENSID, S.; DABIS, F.; SOLTANA, R.; TOUHAMI, M. Incidence of Campylobacter Infection in Infants in Western Algeria and the Possible Protective Role of Breast Feeding. *Epidemiology and Infection*, v.105, n.1, p.73-78, 1990.

MENDEZ, M. A.; ANTHONY, M. S.; ARAB, L. Soy-Based Formulae and Infant Growth and Development: A Review. *The Journal of Nutrition*, v. 132, p.2127–2130, 2002

MERRITT RJ, JENKS BH. Safety of soy-based infant formulas containing isoflavones: the clinical evidence. *Journal of Nutrition*, v.134, p.1220S–4S, 2004.

MICHETTI, P; ALSAHLI, M. *Lactobacilli* for the management of *Helicobacter pylori*. *Nutrition*, v.17, n.3, p.268-269, 2001.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*, v.6, n.4, p.263-268, 1990.

MODLER, H.W.; McKELLER, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, v.23, n.1, p.29-41, 1990.

MONTE, C.M.G.; GIUGLIANI, E.R.J. Recommendations for the complementary feeding of the breastfed child: complementary feeding, breastfeeding, child nutrition, diet, weaning. *Jornal de Pediatria*, v.80, n.5, p.S131-S141, 2004.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.99-112, 2006. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/2082/2024>. Acesso em: 03 jun. 2010.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, supl., p.S189-S197, 2006.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, n.1, p.13-126, 1999.

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**, v.23, supl., p.172-176, 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALARCON, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

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, R.P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the effect of inulin. **Food Science and Technology**, v.42, p.1015-1021, 2009.

OMS- Organização Mundial de Saúde. UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância. Proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno. Genebra: OMS, 1989.

OUWEHAND, A.C.; SALVADORI, B.; FONDEN, R.; MOGENSES, G.; SALMINEN, S.; SELLARS, R. Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.380, p.4-19, 2003.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; BRANDT, P.A.V.D.; STOBBERINGH, E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v.118, n.2, p.511-521, 2006.

PENNA, A.L.B. O leite: importância biológica, industrial e comercial. Fisiologia da Produção de leite – Composição, Propriedades Físico-Químicas, Análises. In **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais** / Ed. Maricê Nogueira de Oliveira. São Paulo: Atheneu Editora, 2009.

PENNA, A.L.B. Probióticos: uma alternativa para o setor lácteo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, Porto Alegre, 2002. **Anais**. Porto Alegre: SBCTA. p.4045-4050, 2002.

PENNA, A.L.B. Probióticos: uma alternative para o setor lácteo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (SBCTA), v. 18, p.4045-4050, Porto Alegre, 2002.

PÉREZ, P.F.; MINNARD, J.; ROUVERT, M.; KNABENHANS, C.; BRASSART, D.; ANTONI, G.; SCHIFFRIN, E. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from lactobacilli: an *in vitro* study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5037-5042, 2001.

PHAM, T.T.; SHAH, N.P. Fermentation of reconstituted skim milk supplemented with soy protein isolate by probiotic organisms. **Journal of Food Science**, v.73, n.2, p.M62-M66, 2008.

PHILIPS, M.; KALIASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.276-280, 2006.

PONTES, T.E.; COSTA, T.F.; BRESSAN, A.; MARUM, F.; BRASIL, A.L.B.; TADDEI, J.A.A.C. Nutritional guidance for children and adolescents and the new consumption patterns: advertising, packaging and labeling. **Revista Paulista de Pediatria**, v.27, n.1, p.99-105, 2009.

RAUD, CÉCILE. Alimentos funcionais: a nova fronteira alimentar análise das estratégias de Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Ver. Sociol. Polít.**, Curitiba, v.16, n. 31, p. 85-100, 2008.

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

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2, p.S105-S110, 2002.

RYBKA, S.; KALISAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze dried yoghurts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.51-57, 1995.

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

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.

- SAARINEN, K.M.; BACKMAN, K.J.; JÄRVENPÄÄ, A.L.; KUITUNEN, P.; LOPE, L.; RENLUND, M.; SIIVOLA, M.; SAVILAHTI, E. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.104, n.2, p.457-461, 1999.
- SALMINEN, S.; ISOULARI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **Journal of Pediatrics**, v.149, n.3, p.115-120, 2006.
- SALMINEN, S.; OUWEREHAND, A.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.563-572, 1998.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.
- SAXELIN, M.; KORPELA, R.; MAYARA-MAKINEN, A. Introduction: classifying functional dairy products. In: In: MATTILA-SANDHOLM, T., SAARELA, M., eds. **Functional dairy products**. Boca Raton: CRC: Cambridge: Woodhead, 2003. v.1, cap.1, p.1-16. (Woodhead publishing in food science and technology).
- SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.213-219, 1998.
- SCHMIDT, G.; ZINK, R. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.41-45, 2000.
- SGARBIERI, V.C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, 2005.
- SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, n.17, p.1262-1277, 2007.
- SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Quimica Nova**, vol. 30, n. 7, p.1535-1538, 2007.
- SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano". **Quimica Nova**. vol. 32, n. 5, p. 1253-1261, 2009.
- SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food, product development, marketing and consumer acceptance: a review. **Appetite**, v.51, p.456-467, 2008.
- SPINNLER, H.E.; CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. **Journal of Dairy Research**, v.56, p.755-764, 1989.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.198–203, 2005.

TANNOCK, G.W.; PURDIE, G.; CRANE, J. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0–2 years. **International Dairy Journal**, v.19, p.149–154, 2009.

THIBAUT, H.; AUBERT-JACQUIN, C.; GOULET, O. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.39, p.147–152, 2004.

THOMAS, D.W.; GREER, F.R.; COMMITTEE ON NUTRITION; SECTION ON GASTROENTEROLOGY, HEPATOLOGY, AND NUTRITION. Clinical Report—Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. **American Academy of Pediatrics**, v.126, n.6, 2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS (1998). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - USP. Versão 5.0. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: 24 maio. 2010.

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

VENTUROSO, R.C.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M.; DAMIN, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, p.607–613, 2007.

VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, T.D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1905–1911, 2000.

WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.373–380, 1993.

WEIZMAN, Z.Z.; ALSHEIKH, A.A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, n.5, p.415–419, 2006.

YEO, S.-K.; LIONG, M.-T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, n.2, p.267–275, 2010.

ANEXOS

ANEXO I

Recomendações em nutrientes (g/ 100 Kcal) para a primeira infância.

	Codex Alimentarius ¹		AAP ²		ESPGAN ³	
	mín.	máx.	mín.	máx.	mín.	máx.
Proteína	1,8	3,0	1,8	4,5	1,8	2,8
Gordura	4,4	6,0	3,3	6,0	4,4	6,0
Carboidratos	9,0	14,0	10,0	11,0	8,0	12,0

¹ CODEX, 2011.

² AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1976.

³ KOLETZKO *et al.*, 2005.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Declaramos para os devidos fins que o presente trabalho dispensou análise do Comitê de ética em Pesquisa e/ou Comitê em Experimentação Animal.

São Paulo, 18 de abril de 2011

Ana Lucia O. Pilleggi de Sousa

Prof^a. Dr^a. Maricê Nogueira de Oliveira
Orientador