

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional

Ana Carolina Rodrigues Florence

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

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

São Paulo
2009

Ana Carolina Rodrigues Florence

Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a. Dr.^a. Maricê Nogueira de Oliveira
Orientadora / Presidente

1.º examinador

2.º examinador

São Paulo, _____ de 2009.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado e por ter me guiado em mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Sonia e Guilherme, pela minha existência, pelo apoio necessário, pela formação do meu caráter e por me incentivarem a perseguir meus sonhos e lutar para a concretização dos mesmos.

Aos meus irmãos, Ana Lúcia (Lucinha) e José Guilherme (Zeca), pelo companheirismo, pelo carinho e pelo amor nos momentos mais difíceis de minha vida.

Ao meu avô, Bento (*in memoriam*), minhas avós Dirce e Therezinha pelo amor, pelo encorajamento e por me acolherem durante minha formação.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maricê Nogueira de Oliveira, pelo exemplo de profissionalismo, pelo apoio e orientação e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

Aos meus tios, Amador e Carmo, pelo carinho e auxílio em todos os momentos importantes de minha vida e na concretização de um sonho.

Às minhas amigas Patricia, Rafaella, Bruna, Anna, Mariana, Gláucia e Soraia, e à minha prima-irmã Letícia, por toda cumplicidade, carinho e amizade.

Ao meu amigo Caio, por todo incentivo para meu ingresso no mestrado, pela amizade, carinho e paciência, além de todo auxílio com a disciplina de Matemática.

A todos os colegas do grupo de pesquisa TecLaFA (Tecnologia de Lácteos Funcionais e Análogos): Ana Lúcia, Ana Paula do Espírito Santo, Ana Paula Marafon, Cristina, Daniela, Keila, Maria Regina, Ricardo, e aos estagiários: Michele, Tatiana, Adriana e Douglas, por todo auxílio em análises, pelo companheirismo diário e por todo aprendizado.

À Dr^ª. Roberta Claro pela colaboração e auxílio com as análises cromatográficas.

À doutoranda e amiga Elizabeth pelo auxílio, colaboração e atenção.

Aos colegas de departamento: Adelaida, Elieste, Milena, Flávia, Juliana, Cíntia, Raquel, Regina, Bruno, Daniel, Fabiana, Thaís, Kelly, Virgílio, Camila e Roberta pelo convívio diário, pelas alegrias e auxílios durante toda a jornada do mestrado.

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pelos ensinamentos e por enriquecerem meus conhecimentos.

Aos funcionários, Alexandre, Ivani, Nilton, Fátima, Juarez, Elza e Miriam por toda atenção e auxílio.

Ao Prof. Dr. Adnam Y. Tamime, pelos ensinamentos, sugestões e críticas que só agregaram melhorias a este trabalho.

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

À Prof^a. Dr^a. Célia Colli pelas análises de minerais nos leites.

À Danisco, Christian Hansen e à Globalfood pelo fornecimento das culturas lácticas.

À Fapesp e ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado, e à CAPES, pelo auxílio à pesquisa.

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

RESUMO

FLORENCE, A.C.R.; OLIVEIRA, M.N. Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em co-cultura e em cultura pura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional. São Paulo. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A crescente preocupação com tecnologias sustentáveis e a procura de novos alimentos funcionais despertam o interesse para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios que proporcionem, além da nutrição, benefícios à saúde do consumidor. Assim, esse trabalho visa propor o leite orgânico como potencial matéria-prima para a fabricação de leites fermentados probióticos. Para tanto, estudou-se o perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional, analisando a composição química dos leites, determinando o perfil de acidificação de quatro cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*, verificando a contagem microbiológica das culturas probióticas e iniciadoras nos leites fermentados, examinando o perfil de ácidos graxos e o teor de ácido linoléico conjugado dos leites fermentados e determinando o perfil de textura dos leites fermentados. A maior velocidade de acidificação foi observada para as cepas B94 e BL04 em leite orgânico e para a cepa HN019, para ambos os tipos de leite. As contagens de todas as cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* foram superiores a $8,58 \log_{10}$ unidades formadoras de colônia (UFC).mL⁻¹. O leite orgânico apresentou maiores teores de ferro e proteína, enquanto o leite convencional apresentou maiores teores de gordura e lactose. Os principais ácidos graxos foram pouco influenciados pelo tipo de leite e as maiores quantidades de ácido linoléico conjugado (65 % maior do que o controle) foram encontradas em leite orgânico fermentado com a cepa BB12 em co-cultura com *S. thermophilus*. Assim, verificou-se que o leite orgânico pode ser empregado como matéria-prima na fabricação de leites fermentados probióticos, agregando qualidade nutricional ao produto final.

Palavras-chave: Leite fermentado probiótico. Iogurte. Bifidobactéria. Leite orgânico.

ABSTRACT

FLORENCE, A.C.R.; OLIVEIRA, M.N. Technological profile of bifidobacteria strains in pure culture and in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in organic and conventional milks. São Paulo. 2009. (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University.

The concern about sustainable technologies and demand for new functional foods arouses the interest for the development of new food products in addition to provide nutrition and health benefits to the consumer. Thus, this work aims to offer organic milk as a potential raw material for the manufacture of probiotic fermented milk. Therefore, studying the technological profile of strains of bifidobacteria in pure culture and in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in organic and conventional milks, analyzing the chemical composition of milk; determining the profile of acidification of four strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in pure culture and in co-culture with *Streptococcus thermophilus*; checking the counts of starter and probiotic cultures in fermented milks; examining the profile of fatty acids and conjugated linoleic acid content of fermented milks and the profile of texture of fermented milks. The highest rate of acidification profile was observed for the strains BL04 and B94 in organic milk and for the strain HN019 in both milks. The counts of all strains of *B. animalis* subsp. *lactis* were higher than 8.58 log₁₀ colony forming units (CFU). mL⁻¹. The organic milk had higher levels of iron and protein, whereas conventional milk had higher levels of fat and lactose. The main fatty acids were not influenced by the type of milk and higher amounts of conjugated linoleic acid (65% higher than the control) were found in organic fermented milk with the strain BB12 in co-culture with *S. thermophilus*. Thus, it was found that organic milk can be used as raw material in the manufacture of probiotic fermented milk, increasing nutritional quality to final product.

Keywords: Probiotic fermented milk. Yoghurt. Bifidobacteria. Organic milk

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Leite	4
2.1.1. Leite orgânico	5
2.1.2. Composição	6
2.1.2.1. Proteínas	6
2.1.2.2. Gordura	7
2.1.2.3. Carboidratos	8
2.1.2.4. Vitaminas e minerais	8
2.1.3. Propriedades funcionais do leite	9
2.1.4. Perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado (CLA)	10
2.1.5. Ácido linoléico conjugado como componente funcional	11
2.1.5.1. Ação anticarcinogênica	13
2.1.5.2. Metabolismo de lipídio e proteína	14
2.1.5.3. Ação aterosclerótica	14
2.2. Fermentação ácido láctica	15
2.3. Definição e Legislação de Probióticos	16
2.4. Mercado dos probióticos	17

2.5. Importância dos probióticos	19
2.6. Características das culturas iniciadoras e bifidobactérias.....	22
2.6.1. Culturas iniciadoras	22
2.6.2. As bifidobactérias	23
2.7. Efeitos benéficos de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> e das culturas iniciadoras	25
2.7.1. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12 (Chr. Hansen)	25
2.7.2. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B94 (DSM Food Specialties)	26
2.7.3. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BL04 (Danisco)	27
2.7.4. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HOWARU HN019 (Danisco)	27
2.7.5. <i>Lactobacillus delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB340 (Danisco)	30
2.7.6. <i>Streptococcus thermophilus</i> TA040 (Danisco)	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Leite	33
4.2. Composição química de leites (orgânicos e convencionais)	33
4.3. Fontes de culturas microbianas, reativação e enumeração	33
4.4. Procedimento experimental	34
4.4.1. Preparação dos leites fermentados	34
4.4.2. Fermentação	35
4.5. Análise de ácidos graxos (AG) e CLA	37
4.6. Determinação da Textura	39
4.7. Análises Estatísticas	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Composição química dos leites	40
5.2. Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em co-cultura com <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite orgânico e convencional	41
5.2.1. Parâmetros cinéticos	41
5.2.2. Pós-acidificação, acidez e lactose	44
5.2.3. Contagem microbiológica de culturas iniciadoras e de bifidobactérias	46
5.2.4. Perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado	47
5.2.5. Perfil de textura	52
5.3. Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> em cultura pura em leite orgânico e convencional	55
5.3.1. Parâmetros cinéticos	55
5.3.2. Pós-acidificação, acidez e lactose	58
5.3.3. Contagem microbiológica de culturas iniciadoras e de bifidobactérias	60
5.3.4. Perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado	62
5.3.5. Perfil de textura	66
5.4. Comparação do perfil tecnológico de cepas de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, HN019 e BL04), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)	69
6. CONCLUSÕES	84
7. SUGESTÕES	86
8. REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas metabólicas de formação dos isômeros de CLA	13
Figura 2. Esquema simplificado da descrição dos órgãos do aparelho digestório e sua microbiota	20
Figura 3. Adesão de <i>B. lactis</i> HN019 em células do epitélio intestinal humano <i>in vitro</i>	30
Figura 4. Sistema CINAC	37
Figura 5. Perfil de ácidos graxos e pico de ácido linoléico conjugado obtido através de ésteres metílicos dos ácidos graxos de leite orgânico por cromatografia gasosa	38
Figura 6. Perfil de acidificação de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> leites orgânico e convencional	41
Figura 7. Tempo de Fermentação ($t_{pH4.7}$) das culturas do iogurte (St-LB340), e <i>Streptococcus thermophilus</i> em co-cultura com quatro cepas de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019) em leites orgânico e leite convencional	44
Figura 8. Ácido linoléico conjugado (CLA) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), iogurtes (St-LB340), e leites fermentados por <i>Streptococcus thermophilus</i> em co-cultura com quatro cepas de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019)	51
Figura 9. Perfil de textura de leites fermentados por bifidobactérias em co-cultura com <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite orgânico e convencional	52
Figura 10. Perfil de acidificação de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> em cultura pura em leites orgânico e convencional	55
Figura 11. Tempo de Fermentação ($t_{pH4.7}$) de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB340), <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) e de quatro cepas de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites orgânico e leite convencional	58
Figura 12. Ácido linoléico conjugado (CLA) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), e leites fermentados por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB340), <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) e de quatro cepas de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites orgânico e leite convencional	65
Figura 13. Perfil de textura de leites fermentados por bifidobactérias em cultura pura	66

Figura 14. Tempo para atingir pH5,0 de <i>L. bulgaricus</i> (cepa LB340) e de bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites fermentados a 42°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura, CC e cultura pura, CP)	71
Figura 15. Tempo para atingir pH4,7 de <i>L. bulgaricus</i> (cepa LB340) e de bifidobactérias (cepas BB12, B94, BL04 e HN019) em leites fermentados a 42°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)	72
Figura 16. Pós-acidificação de iogurtes (<i>L. bulgaricus</i> cepa LB340) e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)	73
Figura 17. Pós-acidificação de iogurtes (<i>L. bulgaricus</i> cepa LB340) e de leites fermentados por bifidobactérias (cepas BB12, B94, BL04 e HN019) após 24h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura).....	75
Figura 18. Conteúdo em ácido linoléico conjugado (CLA) de iogurtes (<i>L. bulgaricus</i> cepa LB340) e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)	77
Figura 19. Conteúdo em ácidos graxos saturados (AGS) de leites fermentados por <i>L. bulgaricus</i> cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)	78
Figura 20. Conteúdo em ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) de leites fermentados por <i>L. bulgaricus</i> cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)	79

- Figura 21.** *Breaking point* de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura) 81
- Figura 22.** Firmeza de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura) 82
- Figura 23.** Consistência de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura) 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento experimental para estudar o perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com <i>Streptococcus thermophilus</i> em leites orgânico e convencional	36
Tabela 2. Composição química e certos minerais em leites frescos orgânicos e convencionais	40
Tabela 3. Comparação dos parâmetros cinéticos de acidificação em iogurtes orgânico e convencional (St-LB340 - i.e. controle) e em leites fermentados por quatro cepas de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i>	43
Tabela 4. Pós-acidificação (pH), acidez e lactose de iogurtes e leites fermentados após 24h de armazenamento a 4 °C (D1)	45
Tabela 5. Contagens de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB340) e de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepas (BB12, B94, BL04 e HN019) fermentadas em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> no momento da inoculação no leite (D0) e no produto fermentado após o período armazenamento de 24 h a 4°C (D1)	47
Tabela 6. Teor de ácidos graxos (%) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), iogurtes (I) e leites fermentados (LF)	50
Tabela 7. Parâmetros de textura de iogurtes (I) e leites fermentados (LF) orgânicos e convencionais preparados com bifidobactérias em co-cultura com <i>Streptococcus thermophilus</i>	54
Tabela 8. Comparação dos parâmetros cinéticos de acidificação em leites fermentados orgânicos e convencionais	57
Tabela 9. Comparação da pós acidificação (pH), acidez e lactose de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB340) e <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) e de quatro cepas de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB12, B94, BL04 e HN019)	59
Tabela 10. Contagens da cepa <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB340) e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB12, B94, BL04 e HN019) e <i>S. thermophilus</i> fermentadas em cultura pura em leite orgânico e convencional após a fermentação e	

armazenamento por 24 h a 4 °C	61
Tabela 11. Teor de ácidos graxos (%) em leites frescos orgânicos e convencionais (L) e leites fermentados (LF) por <i>S. thermophilus</i> (St), <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (LB340) e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB12; B94; BL04; HN019)	64
Tabela 12. Parâmetros de textura de leites fermentados (LF) orgânicos e convencionais preparados com culturas puras de diferentes microrganismos	67
Tabela 13. Resultados da ANOVA para os parâmetros cinéticos (V_{\max} , $t_{V\max}$, $pH_{V\max}$, $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,7}$) de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)	70
Tabela 14. Resultados da ANOVA para a pós-acidificação de leites fermentados por bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)	73
Tabela 15. Resultados da ANOVA para a contagem de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)	74
Tabela 16. Resultados da ANOVA para resultados de perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado de leites fermentados probióticos em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)	76
Tabela 17. Resultados da ANOVA para a os resultados de textura (<i>breaking point</i> , firmeza e consistência) de leites fermentados probióticos em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)	80

LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS</i>
AOCS	<i>AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY</i>
BB12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa BB12, Chr. Hansen
BL04	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa BL04, Danisco
B94	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa B94, DSM Food Specialties
B.P.	<i>Breaking Point</i>
CaCO-2	<i>Epithelial colorectal adenocarcinoma cells</i>
CC	Co-cultura
Cinac	<i>Cinetique d' Acidification</i>
CLA	<i>Conjugated linoleic acid</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
CP	Cultura pura
D0	Análise da contagem de bactérias no momento da inoculação no leite
D1	Dia 1 após 24h de armazenamento a 4 °C
Δ9-desaturase	Enzima Δ-9 desaturase

DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
F	Estatística de Fisher
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
GL	Graus de liberdade
HN001	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> cepa HN001, Danisco
HN019	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa HN019, Danisco
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
I	Iogurte
IFOAM	<i>International Federation of Organic Agriculture Movements</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
L26	<i>Lactobacillus casei</i> cepa L26, DSM, Food Specialties
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
LB340	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> cepa LB340, Danisco
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L	Leite fresco
LC	Leite convencional
LF	Leite fermentado
LO	Leite orgânico
log₁₀	Logaritmo na base 10
Mod.	Modelo
N	Newtons
N.s	Newtons por segundo

PCR	Reação de polimerização em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
pH_{V_{max}}	pH no qual V _{max} é atingida
QM	Quadrados médios
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SQ	Soma dos quadrados
St	<i>Streptococcus thermophilus</i> , cepa TA040, Danisco
TGI	Trato gastrointestinal
t_{pH 5,0}	Tempo para atingir pH 5,0
t_{pH 4,7}	Tempo para atingir pH 4,7
TNBS	Ácido tri-nitro-benzeno-sulfônico
t_{V_{max}}	Tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação
TVA	<i>Trans vaccenic acid</i>
UFC.g⁻¹	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC.mL⁻¹	Unidades formadoras de colônia por mililitro
upH	Unidades de pH
upH/min	Unidades de pH por minuto
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
V_{max}	Velocidade máxima de acidificação
ω-3	Ômega-3
ω-6	Ômega-6
WHO	Organização Mundial da Saúde

1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas duas décadas, microrganismos probióticos foram adicionados em vários tipos de alimentos, especialmente nos leites fermentados, cujo valor nutritivo é amplamente reconhecido e seus efeitos benéficos na saúde amplamente documentados (HOIER, 1992; DAVE; SHAH, 1997; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Probióticos têm sido definidos como microrganismos vivos que, quando consumidos em dose adequada, exercem influências benéficas ao hospedeiro, melhorando o balanço intestinal microbiano (FULLER, 1992; ANVISA, 2002; TAMIME, 2005; LJUNGH; WADSTRÖM, 2006; SALMINEN; ISOULARI, 2006). Tais benefícios são amplamente descritos na literatura e podem ser definidos como a imunomodulação (defesas do organismo) e a prevenção de certas doenças e/ou incômodos em humanos, como diarreia devido à infecção com *Helicobacter pylori*, má-digestão de lactose, síndrome do intestino irritável. Além disso, cita-se a prevenção de câncer de cólon e de bexiga, controle dos níveis de colesterol, controle da hipertensão, ação contra infecções do trato urinário e respiratório e supressão de alergias (OUWEHAND *et al.*, 2003; AMROUCHE, 2005; COMMANE *et al.*, 2005).

Para a seleção de uma bactéria probiótica são avaliadas algumas propriedades, como funcionalidade, aspectos tecnológicos e segurança. Os aspectos funcionais são: tolerância à acidez do estômago e da bile, aderência às células do intestino humano, imunoestimulação agindo contra patógenos, agentes cancerígenos e mutagênicos (FUKUSHIMA *et al.*, 1998; ALANDER *et al.*, 1999; DONNET-HUGHES *et al.*, 1999).

A IFOAM (*International Federation of Organic Agriculture Movements* 2007), estabelece que o leite orgânico é aquele produzido em sistema no qual é vetado o uso de agrotóxico sintético, ou outros insumos artificiais tóxicos e o uso de organismos geneticamente modificados, visando ofertar produtos saudáveis e de elevado valor nutricional. A produção orgânica de leite protege o meio ambiente e o habitat natural de diversos animais, já que se fundamenta no emprego de tecnologias limpas e sustentáveis, além de gerar empregos no campo (ROSATI; AUMAITRE, 2004). A princípio, o manejo orgânico resulta em produto seguro, puro e livre de contaminantes químicos (KOUBA, 2003).

O produto orgânico inspecionado por institutos certificadores, associados à IFOAM, detém credibilidade junto ao mercado consumidor. Atualmente, cerca de 60 países possuem seu sistema de certificação implantado. Os principais mercados consumidores e importadores de produtos orgânicos são os países europeus e os Estados Unidos, embora Índia, China e Brasil tenham apresentado grande crescimento nesse setor (HERMANSEN, 2003).

De acordo com o Decreto nº 6323, de 27 de dezembro de 2007, que regulamenta a Lei nº. 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante melhor uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e respeito à integridade cultural das comunidades rurais. Este tem por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais e a minimização da dependência de energia não-renovável. Emprega, sempre que possível, os métodos biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2007).

Atualmente, a produção orgânica no Brasil apresenta crescimento estimado em 30% ao ano, ocupando área de 6,5 milhões de hectares de terras, colocando o país na segunda posição dentre os maiores produtores de orgânicos na América Latina e na 14ª posição mundial em relação ao número de produtores orgânicos (GEMMA, 2008). As maiores concentrações de produtores de agropecuária orgânica encontram-se nas regiões Sul (68%), Nordeste (13%) e Sudeste (10%) (DIAS, 2006).

Estudos mostraram que os alimentos de origem orgânica possuem maior qualidade nutricional. Caris-Veyrat *et al.* (2004) analisaram tomates, em fazendas orgânica e convencional, verificando que os maiores teores de licopeno, β -caroteno, ácido ascórbico, ácido clorogênico, rutina e naringenina foram encontrados na fazenda orgânica. Semelhante estudo, analisando amoras, morangos e grãos de milho, evidenciou que alimentos orgânicos apresentavam mais compostos fenólicos e ácido ascórbico quando comparados aos cultivados sob manejo convencional (FELSOT; ROSEN, 2004). Bergamo *et al.* (2003) verificaram, em produtos lácteos, concentrações significativamente maiores de ácido linoléico conjugado (CLA), ácido *trans*-vacênico (TVA) e até 71% mais de ômega 3(ω -3).

Devido à grande preocupação com tecnologias sustentáveis e à procura contínua por alimentos mais saudáveis e que proporcionem melhora na qualidade de vida, esse trabalho pretende propor o leite orgânico como potencial matéria-prima para a fabricação de leites fermentados probióticos. Para tanto, estudou-se o perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leite orgânico e convencional. O efeito da acidificação por quatro cepas de bifidobactéria na composição química, na contagem microbiológica das culturas probióticas e na textura de leite fermentado orgânico, comparando com o leite fermentado convencional, foi avaliado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis e, a fase interna ou descontínua apresenta, principalmente, micelas de caseína e glóbulos de gordura (SGARBIERI, 2005). 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 nitrogênio não-protéico e 0,7% de teor de cinzas.

O leite possui vitaminas, minerais e ácidos graxos que apresentam, além do aspecto nutricional, características que melhoram a qualidade de vida dos indivíduos, como, por exemplo, o cálcio, responsável pelo fortalecimento dos ossos e da manutenção da homeostasia de diversos sistemas do organismo (GNÄDIG *et al.*, 2003). Além disso, alguns pesquisadores têm demonstrado que existem microelementos que também são importantes e exercem ações sinérgicas contra os radicais livres no corpo. A presença de cobre, zinco e de certos aminoácidos é essencial para o funcionamento do complexo enzimático superóxido dismutase (JOHNSON; GIULIVI, 2005).

Os produtos lácteos constituem a maior parte dos alimentos funcionais e, dentre eles, os leites fermentados e iogurtes são os mais consumidos (GNÄDIG *et al.*, 2003). 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 a diarreia ocasionada por síndrome do intestino irritável (GOTTELAND *et al.*, 2006).

Dentre os componentes do leite, a gordura esteve associada durante anos a uma variedade de doenças humanas, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos saturados (BERGAMO *et al.*, 2003). Porém, recentes estudos evidenciam que componentes saudáveis presentes na gordura láctea, tais como o CLA, adicionam características funcionais ao leite (BERGAMO *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2003).

Deste modo, o leite e seus derivados são considerados alimentos funcionais, de grande interesse na indústria alimentícia, e até mesmo a matéria graxa, presente no leite, possui efeitos muito benéficos à saúde do hospedeiro (CAMPBELL *et al.*, 2003).

2.1.1. Leite orgânico

Durante os últimos anos, o movimento orgânico ganhou grande destaque e número considerável de seguidores em todo o mundo. Produtos de origem orgânica atraem muitos consumidores devido à elevada qualidade nutricional atribuída a esse tipo de manejo e à característica social de sustentabilidade (BERGAMO *et al.*, 2003; FALL *et al.*, 2008).

O objetivo da produção animal orgânica é melhorar o bem-estar e a saúde do animal, prevenindo, dessa forma, doenças. O habitat gerado no sistema orgânico propicia maior liberdade aos animais. Com isso, os produtos oriundos desse manejo possuem maior qualidade. O gerenciamento do bem-estar animal, aliado à menor utilização de insumos químicos sintéticos, hormônios e antibióticos, proporciona a produção de alimentos mais saudáveis (VALLE *et al.*, 2007).

A produção leiteira orgânica e convencional difere consideravelmente na produção dos alimentos para os animais, nos regimes alimentares, no tratamento com antibióticos e quimioterápicos e na manipulação dos animais (FALL *et al.*, 2008).

Todos os padrões de pecuária orgânica especificam regras para a produção de leite e alimentação do gado leiteiro, já que esta deve ser obtida pelo cultivo orgânico, e qualquer substância artificial (ou fonte convencional) é proibida (MOLKENTIN; GIESEMANN, 2007).

A composição de produtos lácteos orgânicos e convencionais tem sido comparada, na última década, para dar autenticidade aos benefícios do sistema de produção natural. Estudos mostram que existem poucas diferenças quanto à composição centesimal (TOLEDO *et al.*, 2002; ROSATI; AUMAITRE, 2004; ELLIS *et al.*, 2006; VICINI *et al.*, 2008; FANTI *et al.*, 2008). No entanto, os produtos lácteos orgânicos são diferentes dos obtidos de forma convencional, principalmente quanto à qualidade da gordura, ao teor de proteínas e às vitaminas (ROTZ *et al.*, 2007). O leite orgânico contém concentrações mais elevadas dos ácidos graxos poliinsaturados,

do ácido α -linolênico (o principal ácido graxo da família ω -3 no leite), do CLA e de antioxidantes lipossolúveis quando comparado ao leite convencional (BUTTLER *et al.*, 2008).

Estudo realizado na Dinamarca com leite produzido em sistema orgânico, quando comparado ao produzido em sistema convencional quanto à análise de minerais, mostrou que o leite orgânico apresentou maior concentração de molibdênio e menor quantidade de bário, manganês e zinco. Os demais macrominerais e microminerais não apresentaram diferenças significativas (HERMANSEN *et al.*, 2005).

Existem diversos estudos científicos relatando a alta qualidade do leite orgânico. Por exemplo, um trabalho conduzido por pesquisadores na Bélgica mostrou que existe número maior de bactérias termofílicas e *Bacillus cereus* (81,3%) no leite orgânico cru, quando comparado ao convencional; por outro lado, o leite convencional pesquisado apresentou grande concentração de *Ureibacillus thermosphaericus* (85,7%) (COOREVITS *et al.*, 2008).

Estudo realizado por Fantí *et al.* (2008) mostrou que a escolha do sistema de manejo (orgânico ou convencional) e a sazonalidade afetam a composição química dos leites, no entanto, a densidade de ambos os leites apresenta variações durante as estações do ano; assim como a acidez, cujos teores são maiores durante o verão. Leites oriundos do sistema orgânico apresentam maiores teores de proteína que os obtidos em sistema convencional, entretanto, tendência oposta é observada em relação aos teores de gordura. Além disso, o teor de CLA dos leites provenientes do sistema orgânico apresentou-se até 2,8 vezes superior ao do convencional.

2.1.2. Composição

2.1.2.1. Proteínas

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 2005).

A principal fonte de proteínas no leite são as caseínas, as proteínas do soro e as imunoglobulinas. As proteínas do leite são ricas em precursores de peptídeos biologicamente ativos. Esses peptídeos são formados a partir da hidrólise enzimática de proteínas ou pela

atividade proteolítica das bactérias ácido-láticas em fermentações microbiológicas (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003).

As proteínas remanescentes no soro de leite apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor nutritivo, sendo amplamente usadas na indústria alimentícia (ZINSLY *et al.*, 2001).

2.1.2.2. Gordura

A gordura do leite é importante fonte de lipídios da dieta, mesmo quando o leite consumido possui teor reduzido de gordura. O leite é formado por um complexo de lipídios existentes em microscópicos glóbulos de emulsão de óleo em água (SGARBIERI, 2005). É composto por inúmeros ácidos graxos, principalmente os de cadeia média e curta, além de possuir alguns ácidos graxos incomuns, incluindo os insaturados do tipo *trans*, presentes em pequena quantidade.

A composição da gordura do leite sofre alteração sazonal, principalmente na primavera e no outono, dependendo do tipo de dieta ingerida pelos animais. Aproximadamente 62% da gordura do leite é saturada, 30% monoinsaturada, 4% poliinsaturada e 4% de tipos mais incomuns de ácidos graxos. A maioria dos lipídios do leite é composta por triglicerídios, ou ésteres de ácidos graxos combinados com glicerol (98%), e a minoria são fosfolipídios (0,2 a 1%), esteróis livres (0,2 a 0,4%) e traços de ácidos graxos livres (MILLER *et al.*, 2000).

A fração lipídica do leite fornece nutrientes essenciais, tais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos (SGARBIERI, 2005). O leite bovino contém os ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico C18:2, também conhecido como ômega-6 (ω -6), e o α -linolênico C18:3 (ω -3), precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como os ácidos araquidônico e docosaenóico. Os ácidos graxos da família ω -3 e ω -6 desempenham papel fundamental no crescimento neural, na transdução de sinais, na excitabilidade das membranas neurais e na expressão de genes que regulam a diferenciação e o crescimento celulares (PALMQUIST; JENSEN, 2007).

2.1.2.3. Carboidratos

O principal carboidrato do leite é a lactose. A lactose é um dissacarídeo formado por galactose e glicose. Produzida pelas células epiteliais da glândula mamária, é a principal fonte de energia dos recém-nascidos (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003).

A lactose compreende aproximadamente 52% dos sólidos totais do leite desnatado e 70% dos sólidos encontrados no soro do leite. A quantidade de água do leite e, conseqüentemente, o volume de leite produzido pela vaca, depende da quantidade de lactose secretada na glândula mamária. A concentração de lactose no leite é de aproximadamente 4,8% (BRITO *et al.*, 2005). Esse carboidrato é substrato para as bactérias ácido-lácticas que o transforma em ácido láctico, obtendo-se, dessa forma, os leites fermentados. É solúvel em água, razão pela qual, depois da fermentação láctica ou coagulação para a produção de queijo, parece estar presente no soro e apresenta sabor levemente adocicado, em comparação com os outros açúcares (sacarose, glicose). Finalmente, reage com as proteínas do leite ou soro, escurecendo-as, sob altas temperaturas (110 à 150°C), e sendo degradada quando em prolongados períodos de tempo, escurecendo o leite e conferindo-lhe sabor cozido (CHAMPE; HARVEY, 2002).

2.1.2.4. Vitaminas e minerais

O leite contém as principais vitaminas essenciais ao ser humano. Estas, por sua vez, condicionam aspectos nutricionais importantes ao organismo: as vitaminas D e K, essenciais aos ossos; as vitaminas B12 e riboflavina, necessárias ao sistema cardiovascular; a biotina e o ácido pantotênico, importantes para produção de energia; a vitamina A, estímulo do sistema imune; e a tiamina, benéfica para função cognitiva (MILLER *et al.*, 2000).

Além das vitaminas, o leite é rico em minerais, como potássio (140mg), cálcio (125mg), cloro (105 mg), fósforo (96 mg), sódio (30 mg), magnésio (10mg), zinco (0,4mg), ferro (0,1mg), entre outros presentes em quantidades inferiores (MATALOUN; LEONE, 1998).

2.1.3. Propriedades funcionais do leite

O leite bovino contém grande número de ácidos graxos com potencial benéfico à saúde humana. Dentre esses compostos, incluem-se os ácidos graxos poliinsaturados, os isômeros de CLA (C18:2), o ácido butírico (C4:0) e a esfingomiéline (ŻEGARSKA; PASZCZY; PASZCZYK, 2008; SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008).

O perfil lipídico do leite depende tanto do consumo de ácidos graxos quanto da bio-hidrogenação realizada por bactérias ruminais. Muitos fatores afetam a composição de ácidos graxos do leite, incluindo a raça dos animais, a sazonalidade, a localização geográfica, o tipo de pasto e a suplementação da alimentação com óleo (JAHREIS *et al.*, 1997; BERGAMO *et al.*, 2003).

O leite contém ainda vários compostos com funcionalidade biológica. As proteínas presentes no leite, como a caseína e as proteínas do soro, são fontes de peptídeos bioativos, os quais têm sido associados a várias atividades fisiológicas, como atividade anti-hipertensiva, imunomodulatória, antimicrobiana, antioxidante e antitrombótica (HAQUE; CHAND; KAPILA, 2009).

As características funcionais do leite também podem ser acentuadas através da adição de bactérias probióticas e fibras solúveis (prebióticos), as quais têm sido associadas com benefícios à saúde pela melhoria do balanço intestinal microbiano, imunomodulação e prevenção de certas doenças e/ou incômodos em humanos, como diarreia devido à infecção com *Helicobacter pylori*, má digestão de lactose, síndrome do intestino irritável, constipação. Além disso, prevenção de câncer de cólon do intestino e de bexiga, controle dos níveis de colesterol, controle da pressão arterial, infecção do trato urinário, infecções do trato respiratório e supressão de alergias (GOLDIN, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 1998; SALMINEN *et al.*, 1998; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 1999; OUWEHAND *et al.*, 2003; COMMANE *et al.*, 2005; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

2.1.4. Perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado (CLA)

Os ácidos graxos predominantes na gordura do leite são os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), que representam aproximadamente **75** % do total de ácidos graxos, com cerca de 21 % sob a forma de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), cuja prevalência é de ácido oléico (MANSBRIDGE; BLAKE, 1997). Dentre os 12 principais ácidos graxos do leite, somente três ácidos graxos saturados estão relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares: ácido láurico, ácido mirístico e ácido palmítico (GERMAN; DILLARD, 2006).

Apesar dos AGCL estarem presentes em maior quantidade no leite, existem ácidos graxos com propriedades importantes, como o ácido butírico, que é encontrado somente na gordura de ruminantes e que possui atividade anticarcinogênica, assim como o ácido linoléico conjugado e o ácido linolênico (PARODI, 2004). Outros ácidos graxos com características funcionais são o ácido caprílico (C8:0) e o ácido cáprico (C10:0), que possuem atividade antiviral (EBRINGER *et al.*, 2008).

Entre os ácidos graxos poliinsaturados, destaca-se o CLA, que consiste em uma mistura de isômeros de posição geométrica do ácido octadecadienóico (C18:2) com dupla ligação conjugada. O principal isômero de CLA é o *cis*-9, *trans*-11 e outros isômeros formados são o *trans*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 (BERGAMO *et al.*, 2003; COAKLEY *et al.*, 2006; KIM; LIU, 2002; ŽEGARSKA; PASZCZY; PASZCZYK, 2008). As maiores fontes de CLA para os humanos são os alimentos contendo gordura de ruminantes. Produtos lácteos e cárneos têm demonstrado conter as maiores quantidade de CLA, variando entre 0,1% a 2,9 % (BERGAMO *et al.*, 2003; GNÄDIG *et al.*, 2003; SIEBER *et al.*, 2004; PARODI, 2004), sendo esse ácido graxo produzido como um metabólito intermediário das rotas de bio-hidrogenação realizada pelas bactérias ruminais.

Muitos esforços têm sido feitos para entender os fatores e os processos que levam ao aumento do conteúdo de CLA no leite. As pesquisas de Gnädig *et al.* (2003), Sieber *et al.* (2004) e Gonçalves e Domingues (2007) mostram que a suplementação da dieta com ácidos graxos livres favorece a bio-hidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados no trato digestivo de ruminantes e, como consequência, ocorre o aumento da produção de CLA na gordura do leite.

A formação de CLA por algumas cepas de bactérias tem sido documentada desde 1960 (BISIG *et al.*, 2007). Por exemplo, a propionibactéria (JIANG *et al.*, 1998) e algumas culturas iniciadoras do iogurte (LEE *et al.*, 1994; XU *et al.*, 2005; COAKLEY *et al.*, 2006) mostraram-se microrganismos com potencial para serem usados no aumento de CLA em produtos lácteos. No iogurte, existe aumento do teor de CLA através da adição de culturas adjuntas e de ácido linoléico livre, óleo ou lipase solúvel (XU *et al.*, 2005). O interesse nas possíveis aptidões das culturas lácteas iniciadoras de aumentar o conteúdo de CLA em produtos lácteos é abundante.

Como são formadas proporções significativas dos isômeros CLA durante a bio-hidrogenação do ácido linoléico no rúmen pela bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, é esperado que as bactérias utilizadas como culturas lácteas iniciadoras também tenham a habilidade de formar CLA (BISIG *et al.*, 2007). Muitos pesquisadores investigaram a síntese de CLA utilizando estirpes de bactérias selecionadas, sob condições controladas de laboratório ou em sistemas de modelos (JIANG *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2002; KIM; LIU, 2002; RAINIO *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2005; EKINCI *et al.*, 2008). Até o momento, poucos estudos exploraram o efeito de bifidobactéria e de culturas iniciadoras do iogurte cultivadas em leites orgânicos e convencionais (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

2.1.5. Ácido linoléico conjugado como componente funcional

Em 1979, Pariza e colaboradores descobriram que a carne bovina grelhada possuía um componente anti-carcinogênico (PARIZA *et al.*, 1979). Estes mesmos, em 1983, observaram que em extratos de carne existiam componentes mutagênicos e também anti-mutagênicos (PARIZA *et al.*, 1983). Posteriormente, foi visto que o extrato de carne bovina era capaz de prevenir a progressão do tumor em células epiteliais de camundongos (PARIZA; HARGRAVES, 1985). Ha *et al.* (1987) isolaram e caracterizaram esse componente anti-carcinogênico da fração lipídica da carne. Essa fração continha quatro isômeros derivados do ácido octadecadienóico (ácido linoléico), com duas duplas ligações conjugadas. Este ácido graxo tem sido referido como ácido linoléico conjugado ou simplesmente CLA (HA *et al.*, 1987; GNÄDIG *et al.*, 2003).

Estudos em modelos animais têm demonstrado que o consumo de CLA inibe o início da carcinogênese e tumorigênese, reduz a porcentagem de gordura corporal, aumenta a massa

muscular, diminui a aterosclerose, melhora a hiperinsulinemia, estimula o sistema imune, altera a razão lipoproteína de baixa densidade/lipoproteína de alta densidade (AKALIN *et al.*, 2007).

Dentre os isômeros de CLA, o ácido *cis*-9, *trans*-11-octadecadienóico tem sido apontado como o mais ativo biologicamente, por ser o isômero predominante, incorporado aos fosfolípidios das membranas celulares (ALONSO *et al.*, 2003). Esse isômero não é capaz de exercer efeitos sobre a redução da gordura, porém está relacionado com a inibição do crescimento de tumores e com a modulação da resposta imune (PARIZA *et al.*, 2001)

Após a descoberta de Pariza e co-autores, muitas pesquisas foram iniciadas, sendo dada atenção particular ao desenvolvimento de técnicas analíticas adequadas para determinar a mistura de isômeros presentes nos alimentos (GNÄDIG *et al.*, 2003). O aumento no teor de CLA no leite foi alcançado através da manipulação da dieta dos animais, do manejo a pasto, da suplementação da dieta com óleos e da correção da concentração do feno (BERGAMO *et al.*, 2003).

A presença de CLA na gordura do leite de ruminantes está relacionada à isomerização e à bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais, bem como pela atividade da enzima D9-desaturase nas glândulas mamárias (GRIINARI *et al.*, 2000; COLLOMB *et al.*, 2006). Cada rota metabólica (bio-hidrogenação no rúmen e isomerização na glândula mamária) possui diversas etapas, que podem ser vistas na Figura 1. A síntese endógena do CLA na glândula mamária é muito importante, pois a lactação é responsável por aproximadamente 60% da produção desse isômero no leite (GRIINARI *et al.*, 2000).

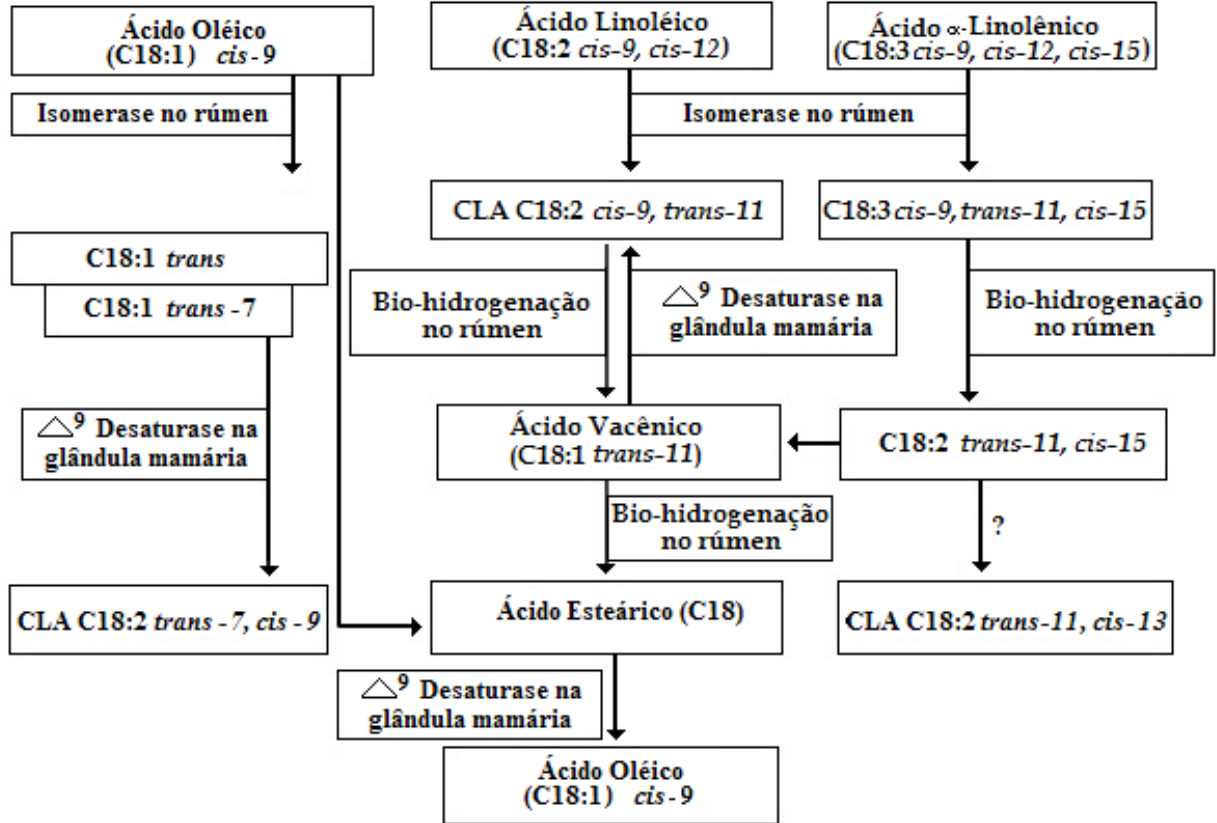


Figura 1. Rotas metabólicas de formação dos isômeros de CLA (Adaptado de Collomb *et al.*, 2006). Legenda: * ? = possível reação de transformação.

2.1.5.1. Ação anticarcinogênica

Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de explorar os efeitos benéficos do CLA no organismo. Foi observado em experimentos *in vitro* e modelos animais que a ingestão diária de CLA pode inibir a carcinogênese (COLLOMB *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que uma grande variedade de tumores celulares, incluindo câncer de mama, câncer prostático, adenocarcinoma pulmonar, melanoma maligno e neuroglioma, apresentaram diminuição associada com a maior ingestão de CLA (PARIZA *et al.*, 1999; LARSSON *et al.*, 2005).

A ingestão de CLA por quatro e oito semanas não previne a ocorrência de carcinoma de mama, entretanto, ratos alimentados com CLA durante todo este período de experimento apresentaram inibição significativa no tumor (GNÄDIG *et al.*, 2003). Dietas contendo 0,5; 1 ou

1,5% da mistura de isômeros de CLA podem reduzir o tumor em 32, 56 e 60%, respectivamente. A inibição do carcinoma de mama pelo CLA ocorre independentemente do nível ou do tipo de gordura ingeridos (IP *et al.*, 1996).

A ação anticarcinogênica do CLA se deve aos seguintes mecanismos: ação antioxidante, ação citotóxica, interferência na proliferação do receptor de estrógeno, indução de apoptose, regulação da expressão gênica, entre outros (GNÄDIG *et al.*, 2003).

2.1.5.2. Metabolismo de lipídio e proteína

Experimentos envolvendo ratos e porcos demonstraram que o CLA pode alterar a composição corpórea, diminuindo a quantidade de gordura e aumentando a massa muscular (PARK *et al.*, 1997).

Dados semelhantes foram obtidos em ensaios realizados com ratos de ambos os sexos, quando foi observada maior perda de gordura pelas fêmeas. Os autores reportaram que os efeitos observados na alteração da composição corpórea são devido à ingestão dos isômeros de CLA t10 e c12 (PARK *et al.*, 1999).

Devido ao aumento de sujeitos obesos e com sobrepeso na população ocidental, o CLA tem sido sugerido como um bom candidato para modular a diminuição da gordura corpórea (BLANKSON *et al.*, 2000).

Os efeitos do CLA na composição corpórea parecem ser específico-dependentes, sendo que o mecanismo de ação pelo qual esse composto pode reduzir a quantidade de gordura no organismo não foi completamente elucidado (MOURÃO *et al.*, 2005).

2.1.5.3. Ação aterosclerótica

As doenças cardíacas induzidas pela aterosclerose despertam grande interesse, por se tratar de uma das causas mais frequentes de infarto e de acidente vascular cerebral. Estudos recentes, realizados *in vivo*, demonstraram que o CLA diminui significativamente a quantidade de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em coelhos, além de proteger contra acúmulo de

lipídios nas artérias, verificando-se que a diminuição das lesões ateroscleróticas foi de até 30% (KRITCHEVSKY *et al.*, 2000).

Em modelos animais, utilizando hamsters, somente o isômero de CLA *trans*-10, *cis*-12 e não o *cis*-9, *trans*-11 (18:2), foi capaz de diminuir os triacilgliceróis, o colesterol total e as lipoproteínas de densidade intermediária, de baixa densidade e de densidade muito baixa (IDL, LDL e VLDL, respectivamente) (GAVINO *et al.*, 2000).

2.2. Fermentação ácido-láctica

A fermentação ácido-láctica constitui uma das formas mais antigas formas de conservação de produtos lácteos, como queijo, iogurte, leites fermentados, bebidas lácteas, manteiga, entre outros (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997). A acidificação do leite, além da obtenção de um produto final, cujo sabor e textura sejam reconhecidamente muito apreciados, agrega características funcionais (SALMINEM, 1995; SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

A fermentação láctica promove a conversão dos carboidratos em ácidos orgânicos, como o láctico e o propiônico (DRIESSEN; LOONES, 1992). Para a formação desses ácidos orgânicos, são acrescidas bactérias ácido-lácticas (LAB - *Lactic Acid Bacteria*) que agrupam uma variedade de diferentes gêneros taxonômicos extremamente importantes para a indústria de alimentos e que são tradicionalmente usadas em grande diversidade de alimentos fermentados, como queijo, leite fermentado, carne e produtos de origem vegetal (FERREIRA, 1995; KLEIN *et al.*, 1998; GIRAFA; NEVIANI, 2000; HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

As LAB são caracterizadas como Gram-positivas, não-esporogênicas e acumuladoras de ácido láctico como produto de seu metabolismo. Historicamente, foram incorporadas nos alimentos para reduzir a degradação e prolongar a viabilidade dos produtos alimentícios, permitindo, assim, o estoque por longos períodos (FERREIRA, 2003).

Recentemente, as propriedades de promover a saúde atribuída às LAB específicas (especialmente os *Lactobacillus* e as bifidobactérias) têm ampliado suas aplicações nos alimentos que beneficiam a saúde (SALMINEN; VON WRIGHT, 1998; HELLER, 2001). Entretanto, algumas espécies de LAB podem conferir características distintas aos produtos alimentícios,

tendo em vista que os produtos metabólicos finais de certas culturas, ou a combinação de culturas, podem produzir resultados sensorialmente indesejáveis (HELLER, 2001).

2.3. Definição e legislação de probióticos e de alimentos funcionais

A primeira menção a "probióticos" foi proposta no trabalho de Metchnikoff (1907), que constatou que, nos países búlgaros, os habitantes consumiam grande quantidade de leites fermentados e apresentavam longevidade e boa saúde. Desse modo, Metchnikoff preconizou a ingestão de bactérias lácticas, por reduzirem as desordens intestinais e melhorarem o trânsito digestivo e, portanto, serem capazes de aumentar a expectativa de vida (GOURNIER-CHÂTEAU *et al.*, 1994).

O termo probiótico deriva de duas palavras gregas, “pros” e “bios”, que significam literalmente “pela vida”, contrário ao termo antibiótico, que significa "contra a vida". Esse termo foi introduzido pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para descrever as substâncias produzidas por um microrganismo que estimulava o crescimento de outros microrganismos. Desde então, várias definições foram feitas para os probióticos, dependendo de seus efeitos sobre a saúde do hospedeiro (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Parker (1974) designou, para o termo probiótico, a conotação de microrganismos e substâncias que contribuem para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. Essa definição engloba os microrganismos, os metabólitos microbianos e seus subprodutos. Fuller (1989) redefiniu os probióticos como sendo “preparações microbianas vivas utilizadas como aditivo alimentar e que têm ação benéfica sobre o hospedeiro, melhorando a digestão e a higiene intestinal” (AMROUCHE, 2005).

De acordo com a definição adaptada pelo grupo misto formado pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO), probióticos são “microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas e que são benéficos para a saúde do hospedeiro” (FAO/ WHO, 2002).

No Brasil, a Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, considera probióticos como microrganismos vivos capazes de melhorar o

equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002).

Segundo a legislação brasileira (ANVISA, 1999), alimento funcional é definido como o alimento ou ingrediente, que para alegar propriedades funcionais ou de saúde deve, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Considera-se alegação de propriedade funcional aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não-nutriente tem no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano, mediante demonstração da eficácia.

Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não é necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem. No caso de nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não-nutrientes e à redução de risco a doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças (ANVISA, 1999).

2.4. Mercado dos probióticos

O conceito de alimentos funcionais foi descrito inicialmente pelos cientistas japoneses na década de 1980, quando estudavam as relações entre nutrição, satisfação sensorial e modulação dos sistemas fisiológicos. Estes estudos tiveram como base resultados obtidos principalmente com *Lactobacillus casei* Shirota (HOSOYA, 1998).

Os alimentos e ingredientes funcionais incluem probióticos, prebióticos, algumas vitaminas, minerais, entre outros e são encontrados em diversos produtos como cereais, leites fermentados, iogurtes e isotônicos em alimentos para nutrição infantil e neonatal e com baixo teor de açúcar ou dietéticos (SANDERS, 1998).

As indústrias alimentícias têm investido muito nas últimas décadas no lançamento de produtos que atendam à demanda dos consumidores que buscam alimentos que estejam relacionados com hábitos de vida saudáveis (MENRAD, 2003).

O mercado global de alimentos funcionais movimentou mais de 33 bilhões de dólares, com crescimento anual de 5% (SHAH, 2001; ANDLAUER; FÜRST, 2002; MENRAD, 2003; SIRÓ *et al.*, 2008). O principal crescimento nesse setor é o de produtos lácteos funcionais. Na Europa, Alemanha, França e Holanda, além do Reino Unido, são os mercados mais importantes de produtos funcionais (HILLIAM, 2000; MÄKINEN-AAKULA, 2006). O mercado holandês movimentou, em 2004, 384 milhões de dólares, tornando o país o 6º maior produtor europeu (MÄKINEN-AAKULA, 2006). O mercado de produtos funcionais, que representava 8 bilhões de dólares em 2003, apresentou um crescimento de quase 100% em 2006, movimentando 15 bilhões de dólares (KOTILAINEN *et al.*, 2006).

Os produtos contendo microrganismos probióticos representam um nicho de grande crescimento, com intenso investimento em pesquisa, principalmente para o desenvolvimento de produtos lácteos probióticos, sendo as espécies *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus faecium e Enterococcus faecalis*, *S. thermophilus*, *Lactococcus sp.*, *Saccharomyces boulardii*, entre outras, as mais empregadas (DRIESSEN; LOONES, 1992; STANTON *et al.* 2001; SAXELIN, 2008).

Em 1997, os alimentos probióticos representavam 65% do mercado total de alimentos funcionais, correspondendo a 889 milhões de dólares, e, destes, 219 milhões eram representados pelo mercado consumidor da França (HILLIAM, 1998). Os produtos lácteos probióticos representavam, em 1999, 1,35 bilhões de dólares (HILLIAM, 2000) e aproximadamente 56% da venda de todos os produtos funcionais em 2004 (BENKOUIDER, 2005). As vendas de produtos contendo probióticos nos Estados Unidos representavam 746 milhões de dólares, em 1997, com taxa de crescimento de 7,1% ao ano; em 2010, estima-se a movimentação de 1,1 bilhão de dólares (KHAN; ANSARI, 2007).

No Brasil, o faturamento relacionado à comercialização dos alimentos funcionais tem crescido cerca de 20% ao ano; entretanto, ainda é considerado proporcionalmente pequeno, atingindo 641 milhões de dólares em 2005 (SBAF, 2006). Dentre os produtos funcionais,

destacam-se os produtos contendo probióticos, sendo os leites fermentados aromatizados, as bebidas lácteas e os iogurtes os mais consumidos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Estima-se que o consumo de leites fermentados contendo probióticos no Brasil seja de aproximadamente 120 mil toneladas ao ano (FOOD INGREDIENTS, 2000). Os produtos lácteos funcionais têm apresentado crescimento de 40% ao ano; entretanto, os líderes no mercado de iogurtes probióticos apontam que esse tipo de produto só está presente em 7% dos lares brasileiros e que o consumo anual é de 6 quilogramas ao ano por habitante, um volume muito pequeno, se comparado ao da França, onde o consumo anual é de 30 quilogramas, ou ao da Argentina, com consumo de 16 quilogramas por habitante (SALGADO; ALMEIDA, 2008).

2.5. Importância dos probióticos

O trato gastrointestinal (TGI) é um ecossistema complexo, que engloba o epitélio gastrointestinal, o sistema imune e a importante microbiota. Esses componentes exercem funções complementares a fim de manter a homeostase no organismo. Quando existe desequilíbrio nesse ecossistema, podem ocorrer diversas patologias (MCCRACKEN; LORENZ, 2001).

A Figura 2 mostra os principais órgãos que constituem o trato gastrointestinal (TGI) humano e as interações entre os microrganismos existentes (HOOPER; GORDON, 2001).

Do ponto de vista microbiológico, o ambiente do TGI compreende três regiões principais que oferecem condições muito diferentes para a sobrevivência dos diferentes microrganismos. No estômago, a proliferação microbiana é fortemente reduzida devido à presença de oxigênio e de ácidos fortes, como o ácido clorídrico. Somente os microrganismos ácido-tolerantes e anaeróbios facultativos, como *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* e leveduras, são capazes de sobreviver nesse ambiente. No intestino delgado, a microbiota é constituída essencialmente por bactérias anaeróbias facultativas, como *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, e enterobactérias, além das anaeróbias estritas, como bifidobactérias, bacteróides e clostrídios (OUWEHAND; VESTERLUND, 2003; ISOULARI *et al.*, 2004).

No cólon, o trânsito digestivo é mais lento, a microbiota é mais abundante e muito complexa (CUMMINGS *et al.*, 1989; GOUNIER-CHÂTEAU, 1994), sendo dominada pelas

bactérias anaeróbias estrictas (*Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Bifidobacterium sp.*), visto ser esse órgão desprovido de oxigênio.

As bifidobactérias e os lactobacilos, assim como certos enterococos e estreptococos, que distinguem-se pelos seus efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro, como garantir a integridade do intestino, o antagonismo contra os patógenos e a modulação da função imunitária (GIBSON; ROBERFROID, 1995; SCHIFFRIN; BLUM, 2002; RASTALL, 2004).

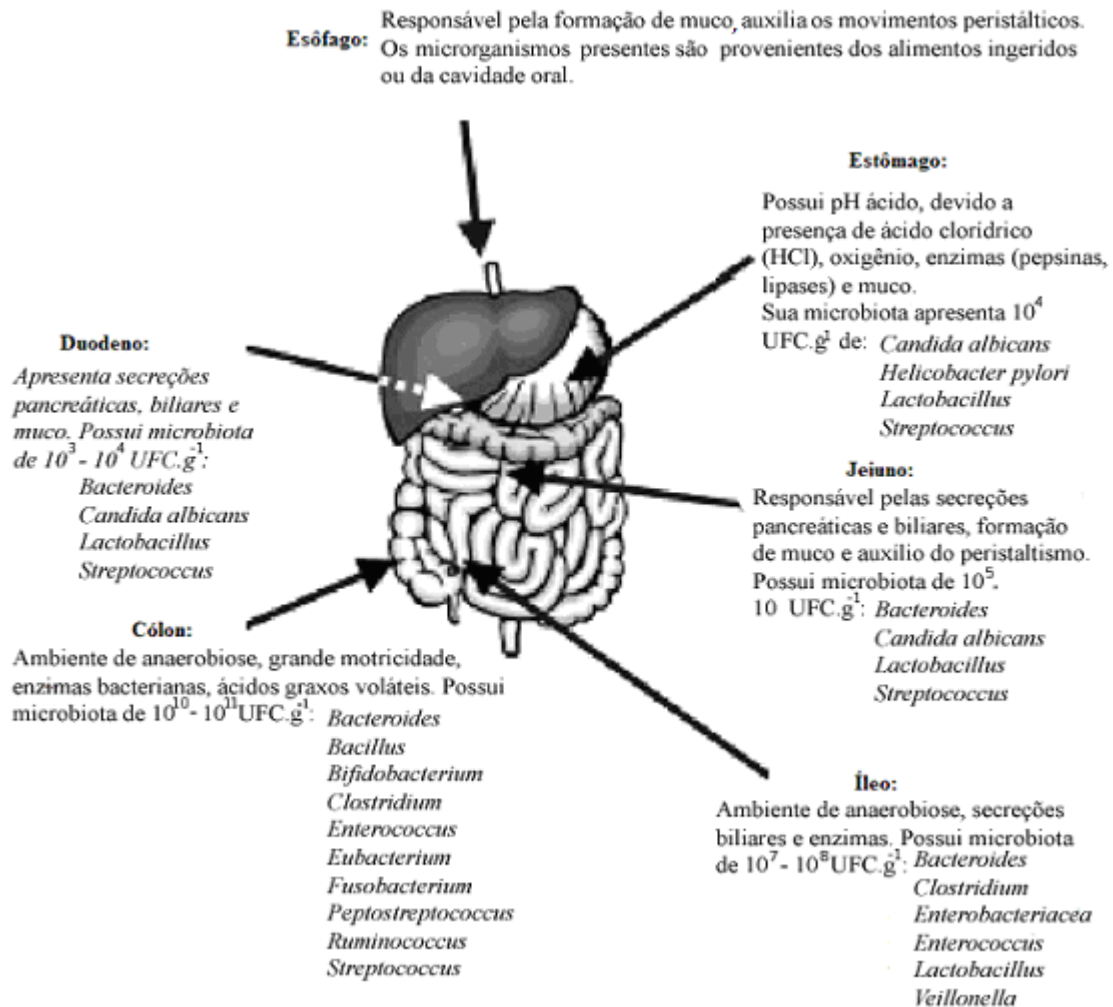


Figura 2. Esquema simplificado da descrição dos órgãos do aparelho digestório e sua microbiota. Adaptado de Ouwehand e Vesterlund (2003).

Os benefícios dos probióticos têm sido reconhecidos e explorados há mais de cem anos. O conhecimento sobre esses microrganismos e suas interações com o hospedeiro tem crescido

desde que estudos publicados comprovaram o mecanismo de ação para essas bactérias (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Os benefícios de saúde proporcionados pelas bactérias probióticas muitas vezes são específicos de determinada cepa. As espécies de *L. rhamnosus* GG, *Saccharomyces cerevisiae* Boulardii, *Lactobacillus casei* Shirota e *Bifidobacterium lactis* BB12 são as culturas mais investigadas. Sua eficácia contra algumas doenças tem sido relatada, como má-absorção da lactose, diarréia ocasionada por rotavírus, diarréia causada por antibioticoterapia e diarréia por *Clostridium difficile* (SHAH, 2006).

Para que os efeitos benéficos sejam alcançados, os microrganismos probióticos devem apresentar células viáveis em quantidades adequadas no alimento. Kurmann e Rasic (1991) recomendam que a dose mínima para causar efeito terapêutico está entre 10^8 e 10^9 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Outros pesquisadores sugeriram contagens entre 10^7 e 10^8 \log_{10} UFC.mL⁻¹ (RYBKA; KAILASAPATHY, 1995; DAVE; SHAH, 1997; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997); este nível pode ser atingido aplicando doses diárias de 100 mL de produtos lácteos contendo 10^7 \log UFC.mL⁻¹ de bactérias probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Muitos fatores podem afetar a viabilidade dos probióticos em preparações comerciais, principalmente em veículos lácteos. Esses fatores foram identificados em leites fermentados, tais como pH e níveis de acidez, presença de outros microrganismos, temperaturas de incubação e/ou presença de oxigênio. Além disso, as bactérias probióticas apresentam baixa atividade proteolítica em leite, o que dificulta seu emprego tecnológico (KLAVER *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2001; LUCAS *et al.*, 2004; DAMIN *et al.*, 2008).

A viabilidade e a atividade das bactérias probióticas são aspectos importantes a serem considerados, pois essas bactérias devem sobreviver no alimento durante a vida-de-prateleira, durante a passagem pelo estômago e resistir à ação das enzimas hidrolíticas e sais biliares no intestino delgado (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

2.6. Características das culturas iniciadoras e bifidobactérias

Muitos microrganismos são empregados na fabricação de queijos e leites fermentados. No desenvolvimento de leites fermentados, muitas vezes são empregadas culturas iniciadoras, também denominadas *starters*, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, devido às suas boas características tecnológicas e sensoriais. A caracterização de bactérias iniciadoras e probióticas tem sido descrita por diversos autores e aproveitadas pelas indústrias de produtos lácteos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995; COGAN; ACCOLAS, 1996; TAMIME; MARSHALL, 1997; SALMINEN; VON WRIGHT, 1998).

2.6.1. Culturas iniciadoras

Streptococcus thermophilus normalmente é utilizado em combinação com outras culturas iniciadoras para a fabricação de queijos, iogurtes e leites fermentados. As principais características de *S. thermophilus* são (ROBINSON, 2002):

- células esféricas ou ovais com 1 µm de diâmetro em cadeias ou em pares;
- bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, imóvel, não-esporulante;
- crescimento entre 40 e 50 °C com auxílio de vitaminas e aminoácidos para máximo crescimento;
- bactérias ácido-lácticas homofermentativas, produtoras de L(+) lactato, acetaldeído e diacetil a partir da lactose do leite;
- membrana celular com peptidoglicanos Lis-Ala₂₋₃;
- secreção de exopolissacarídeos.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* é uma bactéria homofermentativa, ou seja libera ácido láctico durante a fermentação, Gram-positiva e anaeróbia facultativa. É uma das bactérias iniciadoras mais empregadas na fabricação de iogurtes e produtos lácteos (KLEIN *et al.*,

1998). O genoma de *L. bulgaricus* é constituído por cerca de 1,9 milhões de pares de bases. Durante a evolução dessa bactéria, várias vias de transporte e degradação foram inativadas. *L. bulgaricus* teve adaptação rápida ao ambiente lácteo, passando a utilizar a lactose do leite como parte de seu metabolismo de carboidratos (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

As culturas iniciadoras *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* apresentam relação proto-simbiótica no leite, na qual este lactobacilo produz enzimas que degradam a caseína, liberando peptídeos, como metionina, treonina e valina, que agem como fatores de crescimento para *S. thermophilus*; este, por sua vez, libera ácido fórmico e CO₂, proporcionando melhor desenvolvimento de Lb (MARTIN, 2002; OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

As culturas iniciadoras são normalmente adicionadas aos leites fermentados probióticos com intuito de reduzir o tempo de fermentação (DAVE; SHAH, 1997); entretanto, *L. bulgaricus* tende à pós-acidificação no leite fermentado, o que afeta a viabilidade das bactérias probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Outra característica interessante dessas culturas é a função de secretar exopolissacarídeos que contribuem benéficamente na textura do leite fermentado. *S. thermophilus* é muito aplicado na indústria de lácteos devido às suas boas características sensoriais e de textura, as quais são responsáveis pela estabilidade do corpo do leite fermentado durante o armazenamento (VUYST *et al.*, 2003).

2.6.2. As bifidobactérias

As bifidobactérias foram primeiramente isoladas e descritas em 1899-1900 por Tissier (TISSIER, 1900; TISSIER, 1906). Esses microrganismos 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 sp. produz ácido láctico e acético sem produzir CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. Segundo Itsaranuwat *et al.* (2003), existem diferenças morfológicas, havendo o formato de “Y” e membrana em forma de cocos, dependendo da condição de crescimento e/ou de espécies. As bifidobactérias possuem relevante importância, sendo aplicadas

em muitos alimentos fermentados lácteos, devido às suas propriedades tecnológicas e aos seus efeitos, e por estarem associadas com a diminuição na incidência de alergias (BJÖRKSTÉN *et al.*, 2001) e também com a prevenção de algumas formas de câncer (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

De acordo com Sánchez (2006) e D'aimmo (2006), as bifidobactérias:

- fermentam glicose, galactose, lactose e frutose como fontes de carbonos benéficos à promoção da saúde;
- promovem manutenção do balanço na microbiota intestinal;
- protegem o organismo contra patógenos e bactérias putrefativas.

Há evidências de que algumas cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são capazes de inibir o crescimento de *Helicobacter pylori*, através da liberação de bacteriocinas e/ou ácidos orgânicos, e também podem reduzir a aderência de bactérias patogênicas às células epiteliais. Além disso, essas bactérias têm possível papel na estabilização da função da mucosa gástrica e na diminuição da inflamação (GOTTELAND *et al.*, 2006). Finalmente, por serem capazes de degradar e absorver ácidos biliares, elas podem reduzir a secreção de mucina e fluidos que possam contribuir para o desenvolvimento de diarreia ou síndrome do intestino irritável (CAMILLERI, 2006).

Bifidobacterium sp. possui diversos habitats, como o intestino humano, a cavidade bucal e o TGI animal. A temperatura de crescimento ideal de *Bifidobacterium* varia de 37 a 42 °C (DONG *et al.*, 2000). Esse microrganismo faz parte da microbiota humana e possui uma relação simbiótica com o hospedeiro, sendo capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, *E. coli* e outras bactérias patogênicas (BIAVATI *et al.*, 2000).

Do ponto de vista fisiológico, bifidobactérias se caracterizam pela grande atividade enzimática e por serem capazes de utilizar muitos açúcares em seu metabolismo, como a lactose, a galactose, a rafinose, a sacarose, a amilopectina, a amilose e a xilose, e por produzirem ácido láctico e acético (GIBSON; WANG, 1994; YILDIRIM; JOHNSON, 1998).

As bifidobactérias se distinguem dos lactobacilos pela produção da enzima frutose-6-fosfato e de outra enzima, identificada como β -galactosidase (ZARATE *et al.*, 1990; HUGHES; HOOVER, 1995; TANNOCK *et al.*, 2004). Os métodos de identificação das bifidobactérias são baseados em suas propriedades fenotípicas e bioquímicas (morfologia celular, fermentação dos açúcares).

As novas metodologias de biologia molecular, principalmente o sequenciamento de RNA ribossomal, têm permitido diferenciar as várias espécies e subespécies de *Bifidobacterium* (MIYAKE *et al.*, 1998; VENTURA *et al.*, 2004; MASCO *et al.*, 2004).

2.7. Efeitos benéficos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e das culturas iniciadoras

2.7.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen)

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB12 tem sido vastamente empregada em diversas formulações alimentícias devido à sua forte adesão à mucosa intestinal humana e à sua grande capacidade de colonização.

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando essa estirpe foram realizados a fim de se determinar os efeitos benéficos de *B. lactis* BB12 e *L. acidophilus* La-5. Esses microrganismos foram testados para a análise de supressão da infecção por *H. pylori* em 59 indivíduos assintomáticos; durante seis semanas, os indivíduos do estudo receberam iogurtes contendo *L. acidophilus* ou *B. lactis*, duas vezes ao dia. O grupo controle foi formado por 11 indivíduos que receberam leite placebo. A administração do iogurte por seis semanas mostrou que houve diminuição da atividade de urease de *H. pylori*. Neste estudo *B. lactis* mostrou ser a principal responsável pela supressão da infecção por *H. pylori* (WANG *et al.*, 2004).

Um estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, com 69 prematuros, para investigar a possível modificação na microbiota intestinal a partir da suplementação alimentar com essa cepa, mostrou que os indivíduos que receberam o tratamento com *B. lactis* BB12 apresentaram (em suas fezes) redução do número de células viáveis de *Enterobacteriaceae*

e *Clostridium sp.* e aumento de *Bifidobacterium sp.*, quando comparados ao grupo controle, que não recebeu probiótico (MOHAN *et al.*, 2006).

2.7.2. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B94 (DSM Food Specialties)

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* B94 é uma cepa única, isolada de uma cultura intestinal humana e não foi geneticamente modificada, segundo a Diretriz Européia 90/220/CEE (DSM FOOD SPECIALTIES, s.d.)

Um estudo comparativo dos efeitos preventivos de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* B94, contra modelo de colite em ratos, foi realizado a partir da indução de colite nos roedores por TNBS (ácido tri-nitro-benzeno-sulfônico). Os ratos começaram a receber oralmente os probióticos duas semanas antes da indução de colite por TNBS e continuaram o tratamento por mais uma semana após a dose de TNBS. Os resultados obtidos mostraram que todos os probióticos exerceram efeitos antiinflamatórios, mas somente os ratos tratados com B94 apresentaram menor incidência de diarreia. *B. lactis* reduziu a produção de fator de necrose tumoral, síntese de óxido nítrico e expressão da cicloxigenase 2 (COX-2) (PERAN *et al.*, 2007).

Outro estudo foi realizado com ratas de oito semanas infectadas por *H. pylori*, que foram tratadas durante cinco semanas com *Lactobacillus casei* L26 ou *B. lactis* B94 e controle, e avaliadas quanto à atividade metabólica em leite e água, modulação do sistema imune e colonização por *H. pylori*. A atividade metabólica foi mantida para os dois probióticos. As ratas que foram tratadas com *L. casei* L26 e *B. lactis* B94 tiveram o infiltrado neutrofílico gástrico e a interleucina (IL-1) significativamente diminuídos e a IL-10 significativamente aumentada, assim como a produção de IL-12/23p40 por B94, quando comparadas com as ratas-controle. O tratamento com probióticos revelou aumento da modulação do sistema imune e diminuição da colonização de *H. pylori* (ZHANG *et al.*, 2008).

2.7.3. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04 (Danisco)

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BL04 foi caracterizada geneticamente e propriamente classificada como *B. lactis* por laboratórios usando métodos genotípicos modernos, incluindo sequenciamento e PCR do gene 16S rRNA, utilizando *primers* espécie-específicos (VENTURA; ZINK, 2002).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que BL04 é extremamente resistente às condições de pH muito baixos e sobrevive na presença de bile no duodeno. Essa bactéria vem sendo amplamente investigada pela sua habilidade em estabilizar a microbiota intestinal durante e após antibioticoterapia (KORZENIK *et al.*, 2005).

Ensaio em modelos animais demonstraram que essa cultura pode modular o sistema imune, proteger contra inflamações intestinais induzidas quimicamente e reduzir sintomas de colite (FOLIGNE *et al.*, 2007).

A habilidade de BL04 estimular imunidade específica foi avaliada em um estudo em humanos, através da medição da resposta imune primária após vacinação, utilizando vacina *Cholerae* como modelo. Os indivíduos do estudo foram suplementados com duas cápsulas/dia contendo 10^{10} log UFC de BL04 ou duas cápsulas de maltodextrina a partir do D₀ até 21 dias. A suplementação com B104 resultou na indução mais rápida de imunoglobulina IgG comparada com o grupo controle. Esse estudo indicou a habilidade específica de *B. lactis* BL04 em estimular resposta imunitária específica (TECHNICAL MEMORANDUM – TM 46-Ie).

2.7.4. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HOWARU HN019 (Danisco)

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* HN019 é fruto de um projeto de pesquisa conduzido no *New Zealand Milk & Health Research Centre* e no *New Zealand Dairy Research Institute*, contando com a colaboração de pesquisadores científicos renomados. Métodos modernos de biologia molecular, como DNA/DNA-homólogos, análise de SDS e *primers* de PCR espécie-específicos, foram usados para identificar essa cepa (PRASAD *et al.*, 1998).

B. lactis HN019, originada de lácteos, foi considerada um probiótico em potencial, baseado em sua capacidade de resistir à bile e a pH bem ácidos *in vitro*. Essa cepa mostrou que é capaz de aderir-se em quantidade elevada e em diferentes tipos de células de epitélio intestinal, como mostra a Figura 3 (GOPAL *et al.*, 2001).

Acredita-se que existam muitos mecanismos pelos quais *B. lactis* HN019 exerce seus efeitos benéficos no sistema imune. Um deles está 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 cepa tende a reduzir o risco de infecções por bactérias severas, como *E. coli*, *Clostridium spp.* e *Bacteroides spp.* (GOPAL; PRASAD; GILL, 2003).

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 (DELCENSERIE *et al.*, 2005). A interação entre as cepas probióticas e os enterócitos é importante para controlar a produção de citocinas e quimiocinas secretadas pelas células epiteliais. Estudos anteriores demonstraram que alguns organismos probióticos podem modular *in vivo* a expressão de moléculas antiinflamatórias de maneira cepa-dependente (HALLER *et al.*, 2000).

Bifidobacterium lactis HN019 apresenta a propriedade de aumentar significativamente, em muitos aspectos, a imunidade celular em modelos animais (GILL, 1998; PRASAD *et al.*, 1998). O consumo de HN019 pode aumentar a atividade citotóxica das células *natural-killers* (NK) e a atividade fagocítica dos monócitos periféricos. Essas atividades diminuem quando o consumo é cessado; entretanto, a atividade fagocítica consegue ser medida até seis semanas após o consumo de *B. lactis* ser interrompido (ZHOU; GILL, 2005).

Chiang e colaboradores (2000) demonstraram que a *B. latis* HN019 está associada com o aumento significativo de dois tipos diferentes de resposta imune celular por dois tipos distintos de leucócitos, a saber: a fagocitose ocorre por células PMN e a atividade antitumoral por célula NK, em humanos saudáveis. Essas respostas são indicadores importantes da imunidade inata (natural) e são largamente empregados para regular a capacidade das intervenções na dieta em estimular o sistema imune (SCHIFFRIN *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1996).

Um estudo em modelo animal, utilizando um grupo de ratos, mostrou que 80% do grupo que recebeu diariamente a cepa HN019, durante uma semana, e subsequentemente foram infectados com *Salmonella typhimurium*, continuavam vivos após três semanas da intervenção. No grupo controle, a mortalidade foi praticamente total, pois somente 7% ainda continuavam vivos após a infecção induzida (SHU *et al.*, 2000).

Outro estudo em modelos animais, envolvendo camundongos que foram alimentados com *B. lactis* HN019, mostrou aumento da atividade fagocítica e da atividade antitumoral, favorecendo a proliferação linfocitária e melhorando a capacidade de secretar citocinas (GILL, 1998; GILL *et al.*, 2000).

Idosos que consumiram *B. latis* HN019 tiveram aumento na capacidade fagocítica dos leucócitos periféricos, através de estímulo por contato direto das LAB e frações extracelulares da parede celular bacteriana (KELLER *et al.*, 1994; MIETTINEN *et al.*, 1996) e na produção de citocinas, como o interferon- α ; entretanto, continua incerto qual tipo celular é primeiramente influenciado pelo probiótico (CHIANG, 2000).

Estudos clínicos desenvolvidos com adultos mostraram que *B. lactis* HN019 foi capaz de melhorar a resposta imune não específica (ARUNACHALAM *et al.*, 2000). Esse tipo de resposta não precisa ser induzida e está sempre pronta para ação, ou seja, age como a primeira linha de defesa contra infecções (GILL *et al.*, 2001).

Um estudo duplo-cego, placebo-controle, envolvendo mais de 600 crianças de um a três anos, indicou que o consumo de *B. lactis* HN019 durante um ano, em combinação com galactooligossacarídeos, reduziu a incidência e a prevalência de disenteria. Além disso, reduziu a duração de doenças graves e de febre e a incidência de infecções do ouvido médio (SAZAWAL *et al.*, 2004).

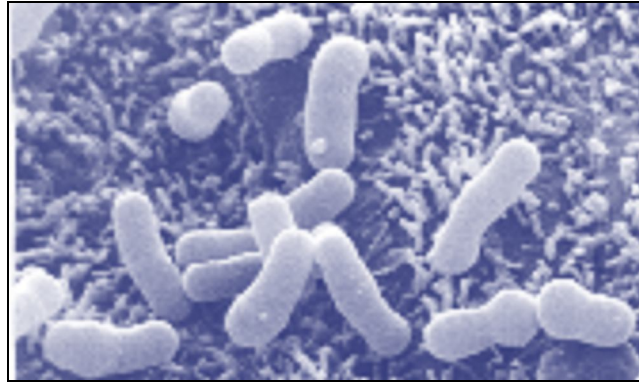


Figura 3. Adesão de *B. lactis* HN019 em células do epitélio intestinal humano *in vitro* (GOPAL *et al.*, 2001).

Um ensaio clínico duplo-cego, placebo-controle, utilizando duas cepas probióticas comerciais (*Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019), foi realizado para 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. A investigação sobre os efeitos das cepas HN019 e HN001 sobre eczema infantil incluiu uma série de parâmetros de segurança que permitiu 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 diferiu 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 (DEKKER *et al.*, 2009).

2.7.5. *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* LB340 (Danisco)

Lactobacillus delbruecki subsp. *bulgaricus* apresentam-se em bastonetes unidos em cadeias longas. Possuem crescimento em temperaturas entre 45 e 50 °C, podendo crescer também

em temperaturas de -15°C (DELLAGLIO *et al.*, 1992). Esses microrganismos utilizam a lactose como substrato energético com liberação de ácido láctico.

2.7.6. *Streptococcus thermophilus* TA040 (Danisco)

S. thermophilus tem sido utilizado amplamente como cultura iniciadora para produção de iogurtes e queijos. É um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, sem motilidade e não-esporogênico.

A taxonomia de *S. thermophilus* tem sido questionada há muitos anos. Farrow e Collins (1984) propuseram que *S. thermophilus* pode ser uma subespécie de *Streptococcus salivarius*, após observações de valores homólogos de DNA-DNA em mais de 70%.

De acordo com a definição de probiótico, o microrganismo deve estar viável no momento da ingestão para conferir o benefício de saúde. Deve, ainda, sobreviver à passagem pelo TGI e colonizar o epitélio. Estudos *in vitro* têm mostrado que *S. thermophilus* tolera condições de pH baixo e sobrevive às concentrações de bile encontradas no duodeno. Além disso, foi mostrado que essa estirpe apresenta excelente adesão a várias linhagens de células do epitélio intestinal, como CaCo-2 e HT-29 (TECHNICAL MEMORANDUM – TM 53- Ie).

Em ensaios *in vitro*, *S. thermophilus* TA040 estimulou a secreção de IL-10, excedendo os níveis dessa mesma interleucina induzida por lipopolissacarídeos. Esse resultado indica que essa cepa pode ter possíveis propriedades antiinflamatórias, sendo ferramenta eficaz como probiótico (LAMMERS *et al.*, 2003).

Ainda assim, *S. thermophilus* não é considerado como cultura probiótica por todos os pesquisadores da área.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos estudar o perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional.

Os objetivos específicos foram:

- (i) analisar a composição química de leites orgânicos e convencionais (gordura, proteína, sólidos totais, densidade, lactose, ácido láctico, valor de pH) e quantificar os principais elementos minerais (cálcio, magnésio, cobre, ferro e zinco) presentes nos leites fermentados;
- (ii) determinar o perfil da acidificação de quatro espécies de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leite convencional e orgânico;
- (iii) verificar a contagem microbiológica das culturas probióticas e iniciadoras dos leites fermentados;
- (iv) examinar o perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado dos leites fermentados;
- (v) determinar o perfil de textura (firmeza, consistência e *breaking point*) dos leites fermentados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Leite

Leites pasteurizados integrais orgânicos e convencionais adquiridos em supermercados locais foram usados para a preparação dos iogurtes e dos leites fermentados probióticos.

4.2. Composição química de leites (orgânicos e convencionais)

Os teores de gordura, proteína, sólidos totais e densidade foram determinados através do Ekomilk[®] (Eon Trading, Bulgária), equipamento de análise de leite por ultrassom, segundo recomendações de Venturoso *et al.* (2007). Os níveis de lactose e ácido láctico foram determinados de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985) e o valor de pH foi medido pelo potenciômetro digital (Mod.8603, Mettler-Toledo, Scherzenbach, Suíça).

O conteúdo de cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn) nos leites frescos foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica (Polarized Zeeman AAS, Hitachi Z-5000; Hitachi, Tokyo, Japan). Uma lâmpada cátoda oca foi empregada sob os comprimentos de onda de 422,7, 202,6, 324,8, 283,4 e 213,9 nm e fendas de 0,7, 1,3, 1,3, 0,2 e 1,3 nm para medir os níveis de Ca, Mg, Cu, Fe e Zn, respectivamente, após digestão por via seca (HNO₃:H₂O₂ - 5:1; mL.100 mL⁻¹) e adição de 0,1 (g.100 g⁻¹) de lantânio como La₂O₃ (para as análises de Ca e Mg), como recomendado pela AOAC (2000). As soluções de trabalho padrão (100 mg.mL⁻¹) foram preparadas com CaCl₂, MgCl₂, CuCl₂, FeCl₃ e ZnCl₂, utilizando Tritisol (Merck, Darmstadt, Germany). Todas as análises químicas foram realizadas em duplicata.

4.3. Fontes de culturas microbianas, reativação e enumeração

As seguintes culturas iniciadoras e probióticas liofilizadas foram empregadas: *Streptococcus thermophilus* (St) TA040 (Danisco, França); *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus LB340 (Danisco, França), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* cepas: BB12 (Chr. Hansen, Dinamarca), BL04 (Danisco, Madison, EUA), B94 (DSM Food Specialities, New South Wales, Austrália) e HN019 (Danisco, Madison, EUA). Cada cultura liofilizada foi pesada e dissolvida em 50 mL de leite desnatado esterilizado (121°C durante 15 min), que foi resfriado a 42°C, 15 minutos antes do uso.

Um mL de cada cultura reidratada durante 15 minutos a 42 °C foi inoculado em 500 mL de leite orgânico e convencional (tratados termicamente a 85 °C por 15 min). Esse procedimento permitiu a obtenção de contagens iniciais de aproximadamente 8,0 log₁₀ unidades formadoras de colônias (UFC).mL⁻¹.

A enumeração de bactérias probióticas e iniciadoras foi feita em duplicata, 24h após a fermentação. Cada amostra (1,0 mL) foi suspensa em 9,0 mL de 0,1 (g. 100 mL⁻¹) de água peptonada, com posterior diluição seriada. Em seguida, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram plaqueados em agar M17 e agar MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido), acidificado com ácido acético para o pH 5,4. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h (DAVE; SHAH, 1996). As cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* foram enumeradas em agar RCA com adição de 1 µL.mL⁻¹ de dicloxacilina, ajuste do pH para 7,1 e adição de 0,3 g.100 g⁻¹ de anilina, com posterior incubação em condições de anaerobiose a 37°C por 72 h (MORIYA *et al.*, 2006).

As condições de anaerobiose foram criadas utilizando-se AnaeroGen[®] (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Placas contendo de 30 a 300 colônias foram enumeradas e as contagens foram expressas em log₁₀ UFC.mL⁻¹ de leites fermentados. A análise microscópica das células de cada cepa de bifidobactéria foi confirmada por microscópio óptico.

4.4. Procedimento experimental

4.4.1. Preparação dos leites fermentados

Os leites pasteurizados integrais orgânicos e convencionais foram tratados termicamente a 85°C, durante 15 min, em sistema contínuo em equipamento de banho-maria (Mod. A100, Lauda[®], Königshofen Pfavistr, Alemanha), sob agitação constante, utilizando agitador mecânico

(Mod. Q250M1, Quimis[®], Diadema, Brasil). A seguir, os leites tratados foram recolhidos em recipientes estéreis de 1L, imediatamente resfriados em banho de gelo até atingirem 10 °C, distribuídos em erlenmeyrs estéreis de 500 mL em câmara de fluxo laminar e acondicionados em câmara fria a 4 °C por 24h antes da utilização.

4.4.2. Fermentação

Os leites orgânicos e convencionais tratados termicamente e resfriados foram divididos em doze ensaios. A seguir, estes foram inoculados com 1 mL de cada cultura segundo o esquema apresentado na Tabela 1. Foram realizados seis ensaios em cultura pura, quando 1 mL de cada bactéria foi inoculado isoladamente. Nos ensaios em co-cultura, inoculou-se 1 mL de cada cepa de bifidobactéria e 1mL de *Streptococcus thermophilus*. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando 44 experimentos.

A fermentação foi monitorada utilizando o sistema CINAC (Ysebaert, Frépillon, França) descrito por Corrieu *et al.* (1988) e Spinnler e Corrieu (1989), o qual permite a medição contínua e a gravação do nível de pH, computando a taxa de acidificação durante o período de fermentação (Figura 4). Esse sistema automático permite a quantificação de cultura iniciadora com base em medidas de valores de pH. Quando o pH 4,7 foi atingido, a fermentação foi interrompida e houve a quebra do coágulo através de agitação manual com auxílio de um bastão de aço inoxidável com disco perfurado; o bastão foi movimentado para cima e para baixo por 60 segundos. O produto fermentado foi dispensado em copos plásticos de polipropileno de 50 mL, selados termicamente, usando o equipamento Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil) e rapidamente resfriados em banho de gelo. O produto fermentado foi estocado a 4°C até ser necessário para as análises.

Cinco parâmetros cinéticos foram calculados:

- $t_{m\acute{a}x}$: tempo no qual se atinge a velocidade máxima (h);
- $V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima de acidificação ($upH.min^{-1}$);
- pH em $V_{m\acute{a}x}$: pH do leite quando a velocidade máxima foi atingida;
- $t_{pH\ 5,0}$: tempo para atingir o pH 5,0 (h);
- $t_{pH\ 4,7}$: tempo para atingir o pH 4,7 (h);

Tabela 1. Planejamento experimental para estudar o perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* para fermentação de leites orgânico e convencional.

Ensaio	Leite	Composição da Cultura	
1	LO	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>L. bulgaricus</i> LB340	CC
2	LO	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> BB12	CC
3	LO	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> B94	CC
4	LO	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> BL04	CC
5	LO	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> HN019	CC
6	LC	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>L. bulgaricus</i> LB340	CC
7	LC	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> BB12	CC
8	LC	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> B94	CC
9	LC	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> BL04	CC
10	LC	<i>S. thermophilus</i> TA040 + <i>B. lactis</i> HN019	CC
11	LO	<i>S. thermophilus</i> TA040	CP
12	LO	<i>L. bulgaricus</i> LB340	CP
13	LO	<i>B. lactis</i> BB12	CP
14	LO	<i>B. lactis</i> B94	CP
15	LO	<i>B. lactis</i> BL04	CP
16	LO	<i>B. lactis</i> HN019	CP
17	LC	<i>S. thermophilus</i> TA040	CP
18	LC	<i>L. bulgaricus</i> LB340	CP
19	LC	<i>B. lactis</i> BB12	CP
20	LC	<i>B. lactis</i> B94	CP
21	LC	<i>B. lactis</i> BL04	CP
22	LC	<i>B. lactis</i> HN019	CP

Legenda: LO = leite orgânico; LC = leite convencional; CC = co-cultura; CP = cultura pura

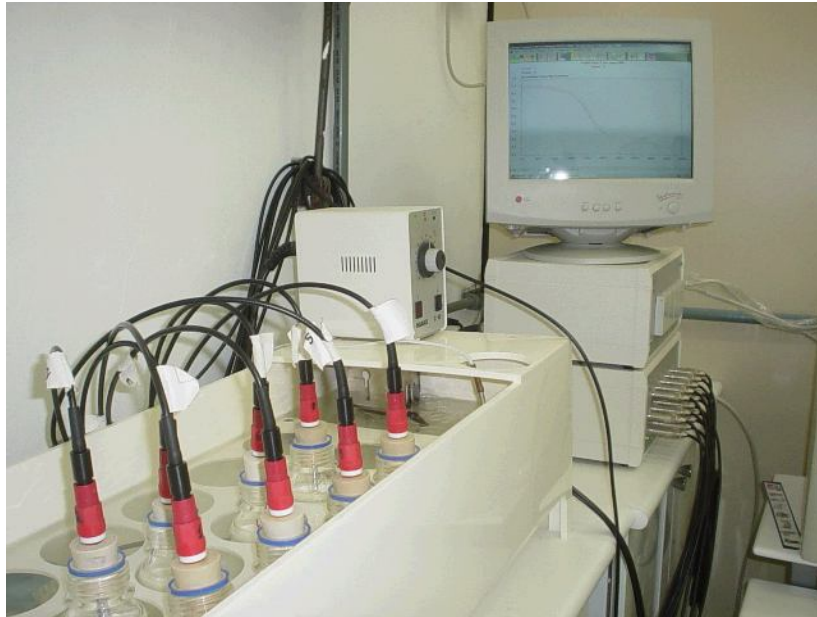


Figura 4. Sistema CINAC (SPINLER; CORRIEU, 1989).

4.5. Análise de ácidos graxos (AG) e CLA

Os lipídios foram extraídos dos leites frescos, iogurtes e leites fermentados (orgânicos e convencionais), de acordo com o método descrito por ISO método 14156 (2001). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram preparados por esterificação, segundo o método ISO 15884 (2002).

As análises dos EMAG foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo 3400CX (Varian, São Paulo, Brasil), equipado com detector de ionização de chama e um pacote de *software* para sistema de controle e aquisição de dados (modelo Star Chromatography Workstation versão 5,5).

Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida Chrompack CP-Wax 52CB (ChromTech Apple Valley MN. EUA), com 30 metros de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,25 μm de polietilenoglicol dentro da coluna, utilizando como gás de arraste o hélio, com vazão de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de *split* de 50:1. A temperatura do injetor foi fixada em $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e do detector em $280 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura da coluna foi inicialmente fixada em $75 \text{ }^\circ\text{C}$ por

3 min, programada até 150 °C, numa razão de 37,5 °C.min⁻¹, e novamente programada até 215 °C a 3 °C.min⁻¹.

Amostras de 1 µL foram injetadas manualmente com tempo de injeção de cerca de 2 segundos. A composição qualitativa das amostras foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa, de acordo com o método oficial Ce 1-62 (AOCS, 1997). Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo os resultados expressos como valores médios. O CLA foi detectado no tempo de retenção de 23,10 min (Figura 5).

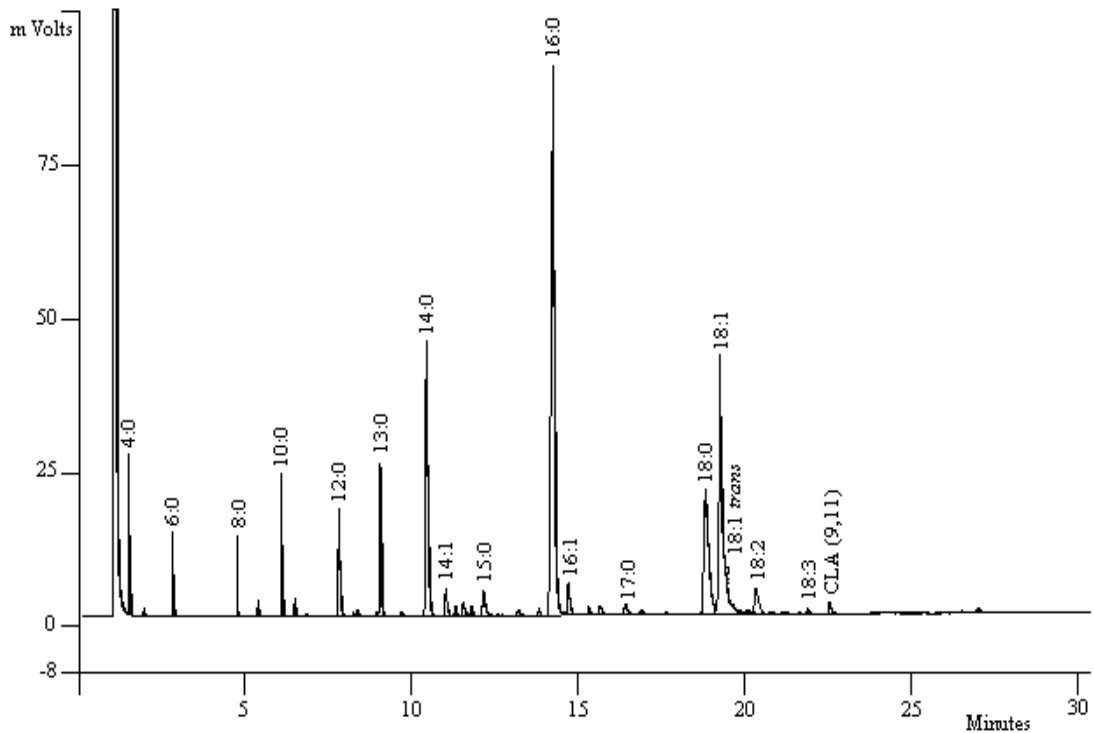


Figura 5. Perfil de ácidos graxos e pico de ácido linoléico conjugado obtido através de ésteres metílicos dos ácidos graxos de leite orgânico por cromatografia gasosa.

4.6. Determinação da textura

A análise do perfil de textura dos leites fermentados foi realizada em amostras mantidas sob temperatura de refrigeração (entre 4 e 6 °C) através de teste de simples compressão com cilindro acrílico de 2,5 cm de diâmetro, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) controlado por microcomputador. A distância percorrida pelo cilindro na amostra foi de 10 mm, à velocidade de 0,67 mm/s. O atributo firmeza em Newtons (N) foi determinado segundo as recomendações de Damin *et al.* (2008), que corresponde à altura do primeiro pico da curva de simples compressão. As análises foram realizadas em sextuplicata, após um dia (D1) de armazenamento dos produtos a 4°C. Além da firmeza, os atributos considerados nesta análise foram: consistência (N.s) e *breaking point* (N) das amostras.

4.7. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos às análises de variância multifatoriais (ANOVA), utilizando o *software* Statistica 6.0 Statsoft (Tulsa, EUA) para comparar diferenças estatísticas significantes entre as amostras. Os valores médios foram comparados usando o teste de Tukey, considerando-se o nível de significância $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química dos leites

A composição química ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) de leites convencionais e orgânicos é apresentada na Tabela 2. Observa-se que existem diferenças estatísticas significativas para alguns componentes dos leites orgânicos e convencionais avaliados. O leite orgânico apresentou teor significativamente maior de proteínas ($P \leq 0,05$); entretanto, tendência oposta foi observada para o teor de gordura e lactose, que foram maiores em leites convencionais, como relatado anteriormente por Fanti *et al.* (2008).

Os conteúdos de Ca e Zn foram maiores nos leites frescos convencionais quando comparados com os leites orgânicos; os teores de Mg e Cu foram semelhantes nos dois tipos de leite; contudo, o teor de Fe foi significativamente maior em leite orgânico ($P \leq 0,05$). Estes dados estão de acordo com os descritos por outros pesquisadores (KOUBA, 2003; CROISSANT *et al.*, 2007).

Tabela 2. Composição química e certos minerais em leites frescos orgânicos e convencionais.

Componente	Leite	
	Orgânico	Convencional
Gordura ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$3,60 \pm 0,03^a$	$3,74 \pm 0,01^b$
Proteína ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$3,72 \pm 0,03^b$	$3,19 \pm 0,03^a$
Lactose ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$5,17 \pm 0,04^a$	$5,34 \pm 0,03^b$
Sólidos totais ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$13,17 \pm 0,06^b$	$12,97 \pm 0,01^a$
Ácido láctico ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,15 \pm 0,01^a$	$0,15 \pm 0,01^a$
pH	$6,62 \pm 0,01^a$	$6,68 \pm 0,02^b$
Densidade ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	$1,032 \pm 0,001^a$	$1,031 \pm 0,001^a$
Ca ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$1,874 \pm 0,144^a$	$1,874 \pm 0,160^a$
Mg ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$0,094 \pm 0,014^a$	$0,091 \pm 0,017^a$
Cu ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$0,082 \pm 0,012^a$	$0,073 \pm 0,013^a$
Fe ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$0,514 \pm 0,113^b$	$0,415 \pm 0,083^a$
Zn ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$3,470 \pm 0,200^a$	$3,616 \pm 0,314^a$

Médias ($n = 12$) \pm desvio padrão com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.2. Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional

5.2.1. Parâmetros cinéticos

O perfil de acidificação de *B. animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* em leites orgânico e convencional pode ser visto na Figura 6. A velocidade de acidificação de culturas iniciadoras do iogurte e de diferentes cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (B94, BB12, BL04 e HN019) em co-cultura com *S. thermophilus* em leites orgânicos e convencionais está mostrada na Tabela 3.

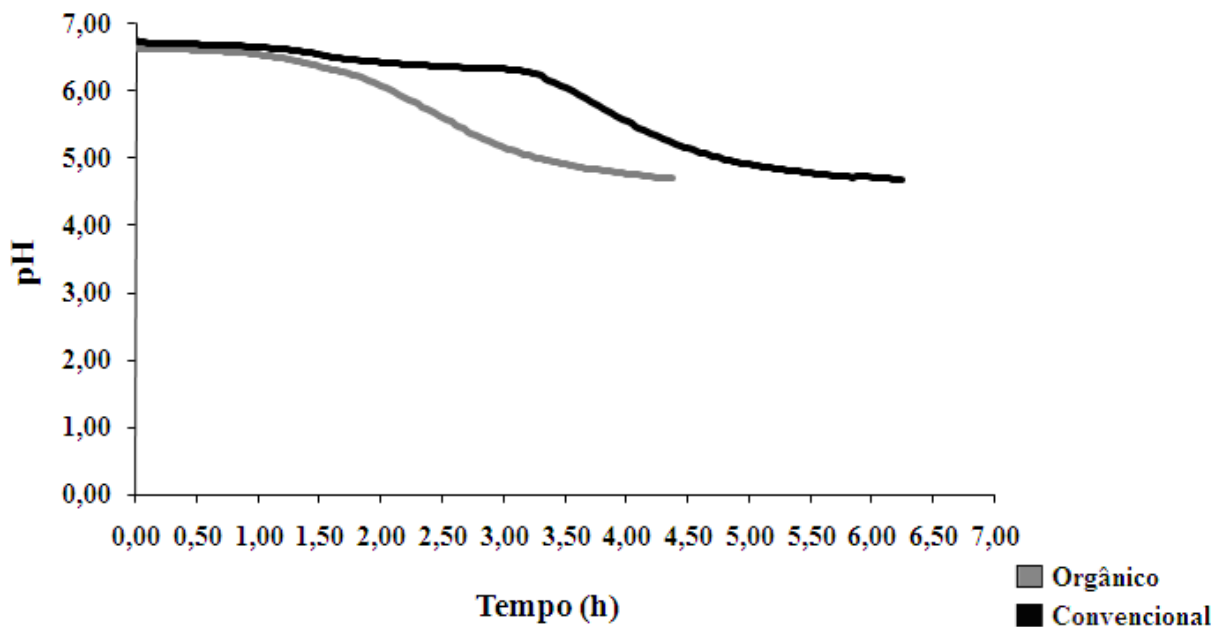


Figura 6. Perfil de acidificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* em leites orgânico e convencional.

A comparação dos parâmetros cinéticos durante a fermentação das quatro diferentes cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* em leites integrais orgânicos e convencionais revelaram resultados distintos. O valor de V_{max} variou entre $17,40 \times 10^{-3}$ e $24,42 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, em leite orgânico, e $17,75 \times 10^{-3}$ e $24,38 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, em leite convencional (Tabela 3). Embora estes valores sejam

semelhantes, a co-cultura St-HN019 apresentou maior velocidade de acidificação em leites orgânico e convencional. Os valores de $t_{V_{\max}}$ variaram de 2,55 h (St-HN019) a 3,77 h (St-B94), com diferenças estatísticas significantes ($P \leq 0,05$), ambas para leite convencional. O pH para atingir V_{\max} foi maior em leites convencionais fermentados por St-B94 e St-BB12 (5,79), enquanto o menor valor de pH foi em leite orgânico fermentado pelas culturas do iogurte (5,39). Resultados semelhantes de $pH_{V_{\max}}$ foram obtidos para as demais co-culturas. No leite orgânico o tempo necessário para atingir pH 5,0 variou de 3,12 a 3,60 h, ou seja, menores valores que os obtidos em leite convencional.

A quantificação da atividade acidificante de bactérias ácido-láticas permite a comparação de diferentes cepas, visando definir melhor o processo de fermentação. Essa atividade acidificante pode ser descrita através das curvas de pH; da medição da diminuição do pH em intervalos regulares mínimos; da velocidade máxima (V_{\max}) de acidificação, que é calculada como dpH/dt , e, além disso, do tempo necessário para atingir V_{\max} e do pH correspondente. De acordo com Picque *et al.* (1992), são estes os parâmetros que melhor descrevem a atividade cinética.

Deve ser enfatizado que foram necessárias 6,02 h para a fermentação da co-cultura St-B94 em leite convencional atingir o pH 4,7, mas a mesma co-cultura necessitou de 4,19 h para atingir o mesmo valor de pH em leite orgânico, ou seja, diminuição no tempo de fermentação de 24,5% (Figura 7). Os resultados de tempo de acidificação obtidos pelas co-culturas St-LB340 e St-BL04 em leite convencional foram muito menores do que os dados relatados em Oliveira e Damin (2003) e Almeida *et al.* (2009). O tempo para atingir o pH 4,7 em leite convencional foi 4,52 h (St-LB340) e 4,77 h (St-BL04); em leite orgânico, o tempo necessário para atingir esse valor de pH para as mesmas culturas foi de 3,72 h e 4,14 h, respectivamente (Figura 7).

Tabela 3. Comparação dos parâmetros cinéticos de acidificação em iogurtes orgânico e convencional (St-LB340 - i.e. controle) e em leites fermentados por quatro cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019) em co-cultura com *S. thermophilus*

Leite	Produto	Co-cultura	V_{\max} (10^{-3} pH unidades min^{-1})	$t_{V_{\max}}$ (h)	pH V_{\max}	$t_{\text{pH}5,0}$ (h)
Orgânico	I	St-LB340	17,40±0,42 ^a	2,62±0,07 ^{ab}	5,39±0,01 ^a	3,12±0,02 ^a
	LF	St-BB12	18,36±0,08 ^a	2,72±0,02 ^{ab}	5,53±0,05 ^{abc}	3,50±0,05 ^{abc}
	LF	St-B94	18,19±0,42 ^a	2,62±0,16 ^{bc}	5,49±0,08 ^{abc}	3,30±0,42 ^{bc}
	LF	St-BL04	18,19±0,28 ^a	2,70±0,00 ^{ab}	5,45±0,09 ^{ab}	3,29±0,12 ^{ab}
	LF	St-HN019	24,42±0,01 ^b	2,62±0,07 ^{ab}	5,63±0,06 ^{abc}	3,37±0,00 ^{abc}
Convencional	I	St-LB340	18,87±2,42 ^a	3,20±0,18 ^{cd}	5,51±0,08 ^{abc}	3,79±0,12 ^{cd}
	LF	St-BB12	23,82±1,25 ^b	2,65±0,03 ^{ab}	5,79±0,01 ^c	3,63±0,00 ^{bc}
	LF	St-B94	17,95±2,23 ^a	3,77±0,09 ^e	5,79±0,14 ^c	4,78±0,07 ^e
	LF	St-BL04	17,75±0,83 ^a	3,32±0,02 ^d	5,54±0,13 ^{abc}	4,12±0,16 ^d
	LF	St-HN019	24,38±0,59 ^b	2,55±0,03 ^a	5,74±0,01 ^{bc}	3,42±0,05 ^{abc}

Legenda: I = iogurte; LF = leite fermentado; V_{\max} = velocidade máxima de acidificação; $t_{V_{\max}}$ = tempo para atingir a V_{\max} ; pH V_{\max} = pH em V_{\max} ; $t_{\text{pH}5,0}$ = tempo para atingir o pH 5,0. Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Vários estudos sobre a cinética de acidificação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e de algumas bactérias probióticas em leite foram relatados por Béal, Louvet e Corrieu (1989), Oliveira *et al.* (2001), Cachon *et al.* (2002), Kristo, Biliaderis e Tzanetakis (2003), Oliveira e Damin (2003), Lucas, *et al.* (2004) e Chammas *et al.* (2006). Entretanto, não existem dados relacionados ao perfil de acidificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em leite orgânico.

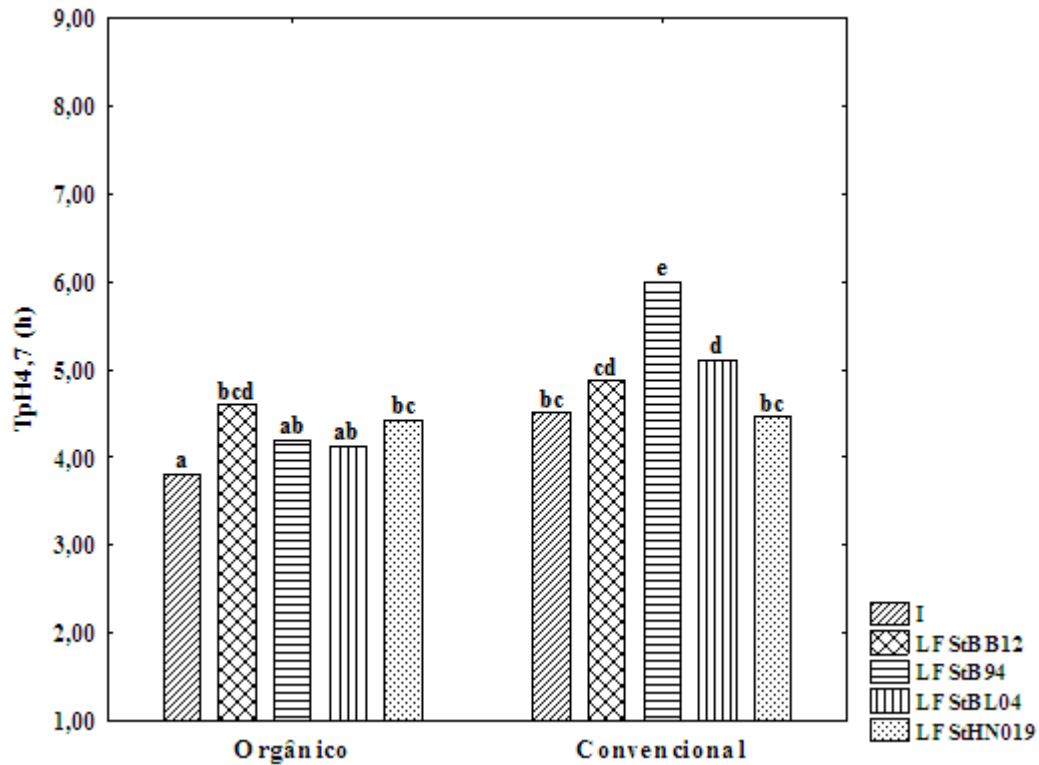


Figura 7. Tempo de Fermentação ($t_{pH4,7}$) das culturas do iogurte (St-LB340) e *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com quatro cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019) em leites orgânico e leite convencional. Médias ($n = 2$) com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.2.2. Pós-acidificação, acidez e lactose

Os resultados de pós-acidificação (pH), acidez e lactose dos leites fermentados e iogurtes em leites orgânico e convencional após 24h de armazenamento estão mostrados na Tabela 4.

Os valores de pH não apresentaram diferenças estatísticas entre os leites fermentados por bifidobactérias em co-cultura com *S. thermophilus*, em ambos os leites. O pH obtido pelas culturas do iogurte também foi muito semelhante. Observou-se um decréscimo médio de 0,196 unidades de pH nos produtos após 24 h de armazenamento a 4 °C.

Tabela 4. Pós-acidificação (pH), acidez e lactose de iogurtes e leites fermentados após 24h de armazenamento a 4 °C (D1)

Leite	Produto	Co-cultura	Ácido láctico (g.100g ⁻¹)	Lactose (g.100g ⁻¹)	pH
Orgânico	I	St-LB340	0,58±0,01 ^a	4,32±0,02 ^{ab}	4,57±0,01 ^c
	LF	St-BB12	0,62±0,01 ^b	4,38±0,02 ^{ab}	4,50±0,01 ^{ab}
	LF	St-B94	0,59±0,01 ^a	4,45±0,05 ^{bcd}	4,56±0,08 ^{abc}
	LF	St-BL04	0,60±0,02 ^{ab}	4,33±0,02 ^{ab}	4,56±0,03 ^{bc}
	LF	St-HN019	0,67±0,00 ^c	4,39±0,04 ^{ab}	4,48±0,01 ^{abc}
Convencional	I	St-LB340	0,71±0,02 ^d	4,64±0,02 ^d	4,53±0,01 ^{abc}
	LF	St-BB12	0,74±0,01 ^e	4,42±0,02 ^{abc}	4,41±0,01 ^a
	LF	St-B94	0,75±0,01 ^e	4,66±0,05 ^d	4,48±0,06 ^{abc}
	LF	St-BL04	0,73±0,01 ^{de}	4,61±0,03 ^{cd}	4,50±0,04 ^{abc}
	LF	St-HN019	0,71±0,01 ^d	4,24±0,06 ^a	4,45±0,02 ^{ab}

Legenda: I = iogurte; LF = leite fermentado; Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Os valores de ácido láctico encontrados nos leites fermentados e iogurte orgânico foram inferiores aos obtidos nos produtos convencionais. O menor teor de ácido láctico foi encontrado no iogurte orgânico (0,58 g.100g⁻¹) e o maior no leite fermentado pela co-cultura St-B94 em leite convencional (0,75 g.100g⁻¹).

Todos os leites fermentados e os iogurtes de ambos os leites revelaram valores residuais elevados de lactose quando comparados aos obtidos por outros pesquisadores (OLIVEIRA *et al.*, 2009a). Este fato pode ser explicado pelo valor de pH de parada da fermentação (pH4,7), sendo maior do que os observados por outros autores, que geralmente tem o final da fermentação com pH 4,5 (DAMIN *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009a; OLIVEIRA *et al.*, 2009b).

5.2.3. Contagem microbiológica de culturas iniciadoras e de bifidobactérias

A Tabela 5 detalha as contagens microbiológicas de culturas iniciadoras e de bifidobactérias no momento da inoculação no leite (D0) e no produto fermentado após o período de armazenamento de 24 h a 4°C (D1).

As contagens de *S. thermophilus* não apresentaram diferenças significativas nos leites fermentados pelas diversas culturas, variando entre 9,00 e 10,14 \log_{10} UFC.mL⁻¹ e estando pelo menos uma ordem de grandeza maior que os demais microrganismos (dados não mostrados). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentou contagem inferior à *S. thermophilus*, em média, 8,22 \log_{10} UFC.mL⁻¹ em leite fermentado orgânico e 8,50 \log_{10} UFC.mL⁻¹ em leite convencional (Tabela 5).

As contagens de *B. animalis* subsp. *lactis* apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$). A maior contagem de bifidobactéria foi de 8,78 \log_{10} UFC.mL⁻¹ para a co-cultura St-BL04, em leite orgânico, e 9,26 \log_{10} UFC.mL⁻¹ para a co-cultura St-BB12, em leite convencional (Tabela 5).

O aumento médio da contagem de todos os microrganismos do momento da inoculação até o término das 24 h de armazenamento nos leites fermentados orgânicos e convencionais foi de 1,09 \log_{10} e 1,22 \log_{10} ciclos, respectivamente.

As contagens obtidas nos produtos após um dia da fermentação atingiram valores requeridos para considerá-los alimentos funcionais, conforme recomendações de Rybka e Kailasapathy (1995), Dave e Shah (1997), Kailasapathy e Rybka (1997), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1999) e Oliveira *et al.* (2002).

Tabela 5. Contagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340) e de *B. animalis* subsp. *lactis* cepas (BB12, B94, BL04 e HN019) fermentadas em co-cultura com *S. thermophilus* no momento da inoculação no leite (D0) e no produto fermentado 24 h após o período de armazenamento a 4°C (D1)

Leite	Produto	Cultura pura	log ₁₀ UFC.mL ⁻¹	log ₁₀ UFC.mL ⁻¹
			D0	D1
Orgânico	I	LB340	7,22±0,25 ^a	8,22±0,32 ^{cd}
	LF	BB12	7,45±0,03 ^{ab}	8,69±0,12 ^{def}
	LF	B94	7,54±0,09 ^{ab}	8,35±0,21 ^{cde}
	LF	BL04	7,51±0,03 ^{ab}	8,78±0,25 ^{def}
	LF	HN019	7,48±0,02 ^{ab}	8,59±0,16 ^{de}
Convencional	I	LB340	7,36±0,05 ^{ab}	8,50±0,04 ^{de}
	LF	BB12	7,80±0,01 ^{abc}	9,26±0,12 ^f
	LF	B94	6,89±0,16 ^a	8,85±0,08 ^{de}
	LF	BL04	7,89±0,02 ^{bc}	8,50±0,01 ^{ef}
	LF	HN019	7,36±0,05 ^{ab}	8,39±0,12 ^{cde}

Legenda: I = iogurte; LF = leite fermentado; Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.2.4. Perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado

A Tabela 6 mostra o teor de ácidos graxos (%) em leite fresco orgânico e convencional (L), nos iogurtes (I) e nos leites fermentados (LF) preparados com St-LB340 (controle) e St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019. A composição dos principais ácidos graxos (%) dos produtos analisados encontram-se no Anexo I.

Ackman (2007) denomina os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como C2 a C4, os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) como C6 a C12 e os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) como C14 a C24.

Os teores de AGCC foram 3,20% em leite fresco orgânico e 3,68% em iogurte orgânico, variando de 2,71 a 3,26% em leites fermentados orgânicos. Em leites frescos, iogurtes e leites fermentados convencionais, os teores de AGCC foram 2,74% e 3,34%, variando de 2,13 a 3,51%, respectivamente, com diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Entretanto, os AGCM e os AGCL variaram ligeiramente nos leites fermentados orgânicos e convencionais.

As maiores quantidades de ácidos graxos saturados (AGS) encontradas nos leites fermentados orgânicos foram observadas quando as co-culturas St-BL04 e St-BB12 (70,35% e 69,63%, respectivamente, $P \leq 0,05$) foram empregadas. Os teores de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) foram, em média, 3,61%, sem diferenças significativas ($P \leq 0,05$). O menor teor de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), isto é, 26,34%, foi encontrado em iogurte orgânico, com diferença significativa ($P \leq 0,05$), quando comparado com as demais amostras (Tabela 6). Os teores de AGS, AGMI e AGPI em leite orgânico estão de acordo com os dados relatados por Fanti *et al.* (2008).

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na concentração de CLA (*cis*-9, *trans*-11) em leite fresco, iogurte e leites fermentados provenientes do manejo convencional. Por outro lado, concentrações superiores de CLA (*cis*-9, *trans*-11) foram encontradas nos leites fermentados com as co-culturas St-BB12 (1,86% \pm 0,06), St-B94 (1,87% \pm 0,29), St-BL04 (1,82% \pm 0,10), St-HN019 (1,47% \pm 0,04) e St-LB340 (1,61% \pm 0,08) com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) perante o leite orgânico fresco (1,14% \pm 0,01) (Figura 8). Estes resultados confirmam dados previamente obtidos em pesquisas conduzidas com diversos produtos lácteos (JAHREIS *et al.*, 1999; OH *et al.*, 2003; COAKLEY, *et al.*, 2006; PRANDINI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Para explicar as variações nos teores de CLA devem ser consideradas as atividades enzimáticas diferentes de cada cultura iniciadora. Estas têm sido identificadas como fatores que podem influenciar o teor de CLA dos produtos lácteos fermentados (SIEBER *et al.*, 2004). Em particular, Lim *et al.* (2003) demonstraram que *Lactobacillus acidophilus* foi capaz de aumentar o teor de CLA em leites fermentados, devido à presença de alto nível da enzima ácido linoléico isomerase.

Estes resultados sugerem que o crescimento de cepas distintas de bifidobactérias em leite orgânico foi capaz de produzir quantidades significativas de CLA nos fermentados e que estes produtos podem resultar em propriedades funcionais quando consumidos. Muitos estudos em

modelos animais têm demonstrado que a ingestão desse composto pode inibir o início da carcinogênese (DEVERY *et al.*, 2001), reduzir a gordura corpórea e aumentar a massa muscular (CHIN *et al.*, 1992), diminuir o risco de desenvolver aterosclerose (LEE *et al.*, 1994; NICOLSI *et al.*, 1997), combater a hiperinsulinemia (HOUSEKNECHT *et al.*, 1998), estimular o sistema imune (MILLER *et al.*, 2000) e alterar a razão das frações de colesterol, lipoproteína de baixa densidade e lipoproteína de alta densidade (LEE *et al.*, 1994).

Tabela 6. Teor de ácidos graxos (%) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), iogurtes (I) e leites fermentados (LF)

Leite	Produto	Co-cultura	AGCC	AGCM	AGCL	AGS	AGMI	AGPI
Orgânico	L	--	3,20±0,12 ^{ab}	9,04±0,53 ^a	87,02±0,36 ^{abc}	66,73±0,06 ^{ab}	29,90±0,30 ^{de}	3,41±0,28 ^a
	I	St-LB340	3,68±0,50 ^{ab}	11,58±0,59 ^b	86,95±1,71 ^a	64,72±0,16 ^a	26,34±0,76 ^a	3,27±0,59 ^a
	LF	St-BB12	2,71±0,46 ^{ab}	9,75±0,35 ^{ab}	87,18±0,73 ^{abc}	69,63±3,07 ^b	28,42±0,52 ^{abcd}	3,71±0,20 ^a
	LF	St-B94	3,09±0,78 ^{ab}	10,67±1,72 ^{ab}	87,15±2,37 ^{abc}	68,11±1,31 ^b	27,25±2,17 ^{ab}	3,86±0,70 ^a
	LF	St-BL04	3,26±0,86 ^{ab}	10,70±1,12 ^{ab}	87,26±1,99 ^{abc}	70,35±1,32 ^c	27,90±1,02 ^{abc}	3,75±0,34 ^a
	LF	St-HN019	3,24±0,22 ^b	8,98±0,34 ^a	87,43±0,27 ^{bc}	66,73±0,05 ^{ab}	31,85±0,12 ^e	3,45±0,06 ^a
Convencional	L	--	2,74±0,04 ^{ab}	8,73±0,10 ^a	87,37±0,13 ^c	67,06±0,31 ^{ab}	29,48 ± 0,22 ^{cd}	3,73±0,16 ^a
	I	St-LB340	3,34±0,09 ^{ab}	9,26±0,74 ^a	87,10±0,75 ^{abc}	67,90±0,89 ^b	28,55±0,77 ^{bcd}	3,55±0,13 ^a
	LF	St-BB12	3,51±0,48 ^b	10,48±1,07 ^{ab}	87,01±1,47 ^{ab}	68,96±0,97 ^b	27,62±0,83 ^{abc}	3,43±0,14 ^a
	LF	St-B94	2,77±0,31 ^{ab}	9,44±0,08 ^a	87,53±0,33 ^{abc}	66,90±0,60 ^{ab}	29,25±0,40 ^{bcd}	3,85±0,39 ^a
	LF	St-BL04	2,98±1,02 ^{ab}	10,51±0,64 ^{ab}	87,40±1,44 ^{abc}	67,91±1,36 ^b	27,99±0,99 ^{abcd}	3,62±0,21 ^a
	LF	St-HN019	2,13±0,05 ^a	9,70±1,08 ^{ab}	87,95±1,14 ^{bc}	67,75±1,10 ^b	29,11±0,97 ^{bcd}	3,25±0,18 ^a

Legenda: AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; AGCM = ácidos graxos de cadeia média; AGCL = ácidos graxos de cadeia longa; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poliinsaturados. Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

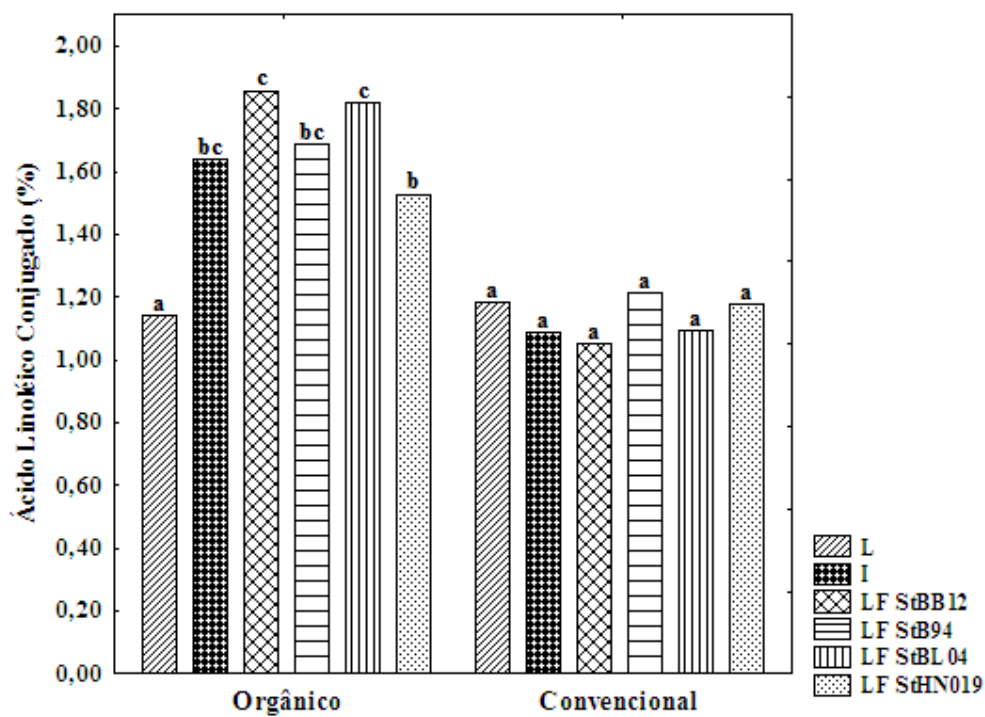


Figura 8. Ácido linoléico conjugado (CLA) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), iogurtes (St-LB340) e leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com quatro cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (St-BB12, St-B94, St-BL04 e St-HN019). Médias ($n = 4$) com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.2.5. Perfil de textura

A curva típica da análise do perfil de textura dos leites fermentados por bifidobactérias é mostrada na Figura 9. Observou-se que todos os produtos convencionais apresentaram maior firmeza, maior consistência e maior valor de *breaking point* quando comparados com os orgânicos, com diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$) (Tabela 7).

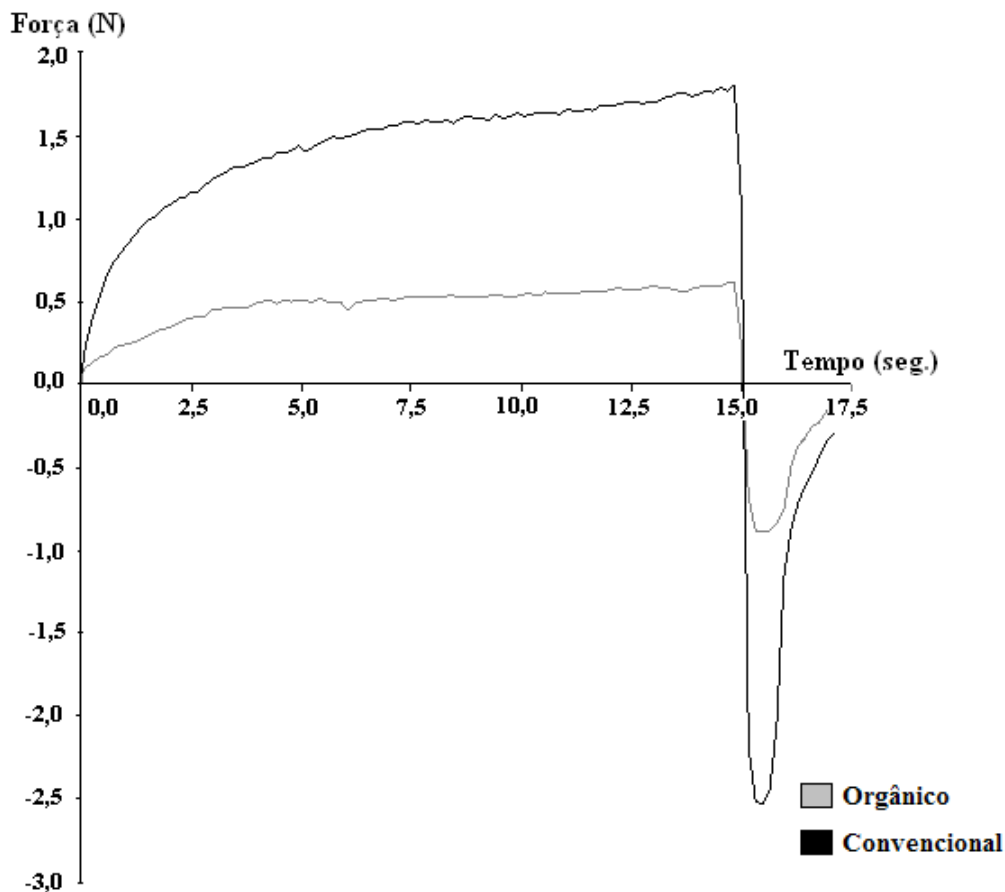


Figura 9. Perfil de textura de leites fermentados por bifidobactérias em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional.

A firmeza variou de 0,48 a 0,66 N, para os produtos orgânicos, e de 1,05 a 1,87 N, para os produtos preparados com leite convencional. Nota-se que as co-culturas que proporcionaram a maior firmeza foram St-BB12 e St-HN019, para ambos os leites (orgânico e convencional).

Para os valores de consistência, observa-se que todos os produtos convencionais apresentaram, em média, valores 2,73 vezes maiores que os orgânicos. Isso pode ser explicado pelo maior tempo de fermentação que resulta em maior firmeza e consistência (DAMIN *et al.*, 2006; DAMIN *et al.*, 2008).

A co-cultura St-HN019 desenvolveu maior firmeza, consistência e *breaking point*. É interessante ressaltar que essa co-cultura apresentou inclusive maiores parâmetros de textura que as culturas do iogurte (Tabela 7).

Em estudos com as culturas St-LB340 e St-BL04 em leite desnatado suplementado com caseinato, a firmeza obtida foi de 0,92 e 0,65 N, respectivamente (DAMIN *et al.*, 2008). As mesmas co-culturas apresentaram, neste estudo, firmeza de 1,05 N (St-LB340) e 1,30 N (St-BL04) em leites fermentados convencionais. A firmeza obtida pelo leite fermentado com a co-cultura St-BL04 e com o iogurte orgânico foi superior à observada por Damin *et al.* (2006) em leite desnatado com 12,4% de sólidos totais.

De acordo com Toba e colaboradores (1990), a metodologia de *back extrusion* empregada na análise do perfil de textura mostra-se útil na distinção de produtos semi-sólidos que apresentem exopolissacarídios com diferentes atributos de textura. Principalmente nos produtos fermentados por estirpes produtoras de polissacarídios, faz-se necessária a escolha de uma metodologia que seja capaz de distinguir os atributos de firmeza, consistência e *breaking point*. As cepas produtoras de exopolissacarídios colaboram para a adesividade do produto. Os parâmetros de firmeza e viscosidade estão mais relacionados com a matriz protéica (RAWSON; MARSHALL, 1997).

Teggatz e Morris (1990) relataram *breaking point* como o ponto de ruptura dos vínculos entre os filamentos de exopolissacarídios e as células bacterianas. A influência da cultura produtora de exopolissacarídios está relacionada com a maior resistência da estrutura do gel ao cisalhamento e às deformidades decorrentes das análises de textura.

Tabela 7. Parâmetros de textura de iogurtes (I) e leites fermentados (LF) orgânicos e convencionais preparados com bifidobactérias em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*

Leite	Produto	Cultura	Firmeza (N)	Consistência (N.s)	B.P. (N)
Orgânico	I	St-LB340	0,49±0,04 ^a	5,72±0,41 ^a	0,40±0,04 ^a
	LF	St-BB12	0,54±0,05 ^a	6,51±0,47 ^a	0,47±0,04 ^a
	LF	St-B94	0,49±0,04 ^a	5,97±0,47 ^a	0,43±0,04 ^a
	LF	St-BL04	0,50±0,04 ^a	5,87±0,31 ^a	0,43±0,03 ^a
	LF	St-HN019	0,66±0,04 ^a	7,74±0,29 ^a	0,56±0,03 ^a
Convencional	I	St-LB340	1,01±0,11 ^b	12,28±2,33 ^b	0,96±0,22 ^b
	LF	St-BB12	1,54±0,04 ^c	18,61±0,38 ^d	1,34±0,02 ^{de}
	LF	St-B94	1,54±0,16 ^c	18,29±1,63 ^c	1,23±0,20 ^{cd}
	LF	St-BL04	1,45±0,20 ^c	15,32±2,10 ^d	1,13±0,09 ^{bc}
	LF	St-HN019	1,83±0,12 ^d	21,66±0,86 ^e	1,48±0,08 ^e

Legenda: B.P. = *breaking point*; N = newtons. Médias (n = 6) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.3. Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em cultura pura em leites orgânico e convencional

5.3.1. Parâmetros cinéticos

O perfil de acidificação de *B. animalis* subsp. *lactis* em cultura pura em leites orgânico e convencional pode ser visto na Figura 10. A velocidade de acidificação de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e de diferentes cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (B94, BB12, BL04 e HN019) em leites orgânicos e integrais está na Tabela 8.

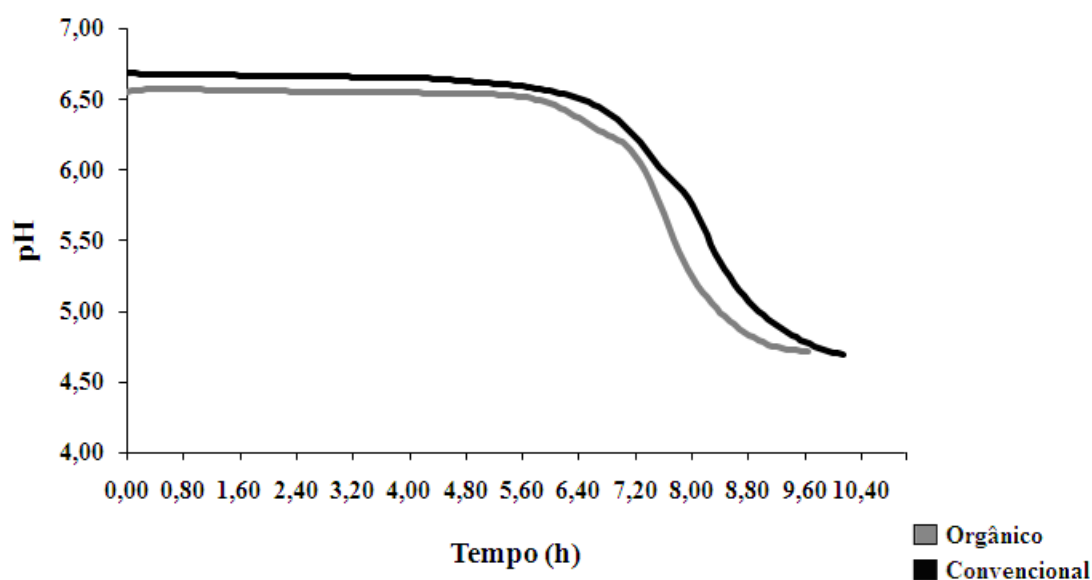


Figura 10. Perfil de acidificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em cultura pura em leites orgânico e convencional.

A comparação dos parâmetros cinéticos durante a fermentação das quatro diferentes cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* em leites integrais orgânicos e convencionais revelou resultados distintos. O valor de V_{\max} variou entre $5,25 \times 10^{-3}$ e $25,01 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, em leite orgânico, e $8,80 \times 10^{-3}$ e $17,68 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, em leite convencional (Tabela 8). A cultura B94 apresentou maior velocidade de acidificação em leites orgânico e convencional. Todas as bactérias, com exceção de B94, apresentaram V_{\max} menores do que os obtidos em co-cultura,

confirmando o estímulo de St na cinética de acidificação (RADKE-MITCHELL; SANDINE, 1986). As bactérias St, LB340 e BL04 apresentaram, em ambos os leites, maiores valores de V_{\max} , quando comparados aos obtidos por Oliveira *et al.* (2009b).

Os valores de $t_{V_{\max}}$ variaram de 3,23 h (St) a 13,37 h (BB12) em leite orgânico, com diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$). O pH para atingir V_{\max} foi maior em leites convencionais fermentados por St e LB340, 6,11 e 5,84, respectivamente, enquanto o menor valor de pH foi encontrado em leite orgânico fermentado por LB340, pH = 4,77. Resultados semelhantes de $pH_{V_{\max}}$ foram obtidos para as demais culturas. No leite orgânico, o tempo necessário para atingir pH 5,0 variou de 4,17 a 16,23 h, resultados superiores aos obtidos em leite convencional.

O tempo necessário para atingir o pH 4,7 variou muito entre as cepas de bifidobactérias em ambos os leites (Figura 10). A cultura BB12 em leite orgânico apresentou tempo de fermentação ($tpH4,7$) de 19,44 h; por outro lado, a mesma cultura necessitou de 10,88 h para atingir o mesmo valor de pH em leite convencional. O tempo necessário para que a cultura B94 atingisse pH 4,7 foi semelhante para os dois leites.

Fato interessante foi observado para a cultura HN019, que apresentou tempo de fermentação de 8,57 h em leite convencional, mas que não conseguiu atingir o pH 4,7 em leite orgânico, mesmo após 13,30 h de processo. A fermentação foi interrompida devido à presença de sinerese. O pH de parada de fermentação 5,0.

Por outro lado, foram necessárias 9,44 h para que a cepa BL04 atingisse o pH final de processo em leite orgânico; já em leite convencional, foram necessárias 12,40 h (Figura 10).

A cultura pura de St apresentou tempo de fermentação curto, de aproximadamente 5,54 h em leite orgânico, com redução de 20,87% em relação ao tempo de fermentação em leite convencional (7,00). Nota-se que existe no leite orgânico algum fator de crescimento que estimula a acidificação do leite por St; fato evidenciado pelas fermentações nas quais essa cultura foi empregada em co-cultura com as cepas de bifidobactérias, reduzindo o tempo para atingir pH 4,7.

Os resultados de tempo de acidificação obtidos pelas culturas LB340 e BL04 em leite convencional e orgânico foram menores do que os dados relatados em Oliveira *et al.* (2009b), em leite convencional.

Tabela 8. Comparação dos parâmetros cinéticos de acidificação de culturas iniciadoras e bifidobactérias em cultura pura em leites fermentados orgânicos e convencionais

Leite	Produto	Cultura pura	V_{\max} (10^{-3} pH unids min^{-1})	$t_{V_{\max}}$ (h)	pH V_{\max}	$t_{\text{pH}5,0}$ (h)
Orgânico	LF	LB340	5,57±0,01 ^{ab}	11,26±0,01 ^e	4,77±0,03 ^a	10,67±0,02 ^{de}
	LF	St	23,68±0,01 ^f	3,23±0,14 ^a	5,68±0,01 ^{bc}	4,17±0,23 ^a
	LF	BB12	5,25±0,57 ^a	13,37±0,33 ^f	5,46±0,23 ^{bc}	16,23±2,12 ^f
	LF	B94	25,01±2,20 ^f	7,60±0,18 ^{cd}	5,67±0,04 ^{bc}	8,34±0,19 ^{cde}
	LF	BL04	13,20±0,07 ^{cd}	7,40±0,18 ^{bcd}	5,21±0,00 ^{ab}	8,03±0,71 ^{bcd}
	LF	HN019	11,73±0,30	11,34±0,09	5,35±0,05	13,17±0,23
Convencional	LF	LB340	10,25±1,17 ^{bc}	6,14±0,76 ^b	5,84±0,13 ^{bc}	8,14±1,04 ^{bcd}
	LF	St	17,58±0,28 ^e	3,70±0,14 ^a	6,11±0,17 ^c	5,27±0,09 ^{ab}
	LF	BB12	14,89±0,45 ^{de}	8,50±0,14 ^d	5,57±0,08 ^{bc}	9,50±0,33 ^{cde}
	LF	B94	17,68±1,2 ^e	8,17±0,05 ^d	5,58±0,08 ^{bc}	8,93±0,00 ^{cde}
	LF	BL04	8,80±1,21 ^{ab}	10,27±0,47 ^d	5,43±0,13 ^{bc}	11,27±0,37 ^e
	LF	HN019	17,10±1,49 ^{de}	6,77±0,42 ^{bc}	5,66±0,32 ^{bc}	7,64±0,05 ^{bc}

Legenda: LF = leite fermentado; V_{\max} = velocidade máxima de acidificação; $t_{V_{\max}}$ = tempo para atingir o V_{\max} ; pH V_{\max} = pH em V_{\max} ; $t_{\text{pH}5,0}$ = tempo para atingir o pH 5,0. Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

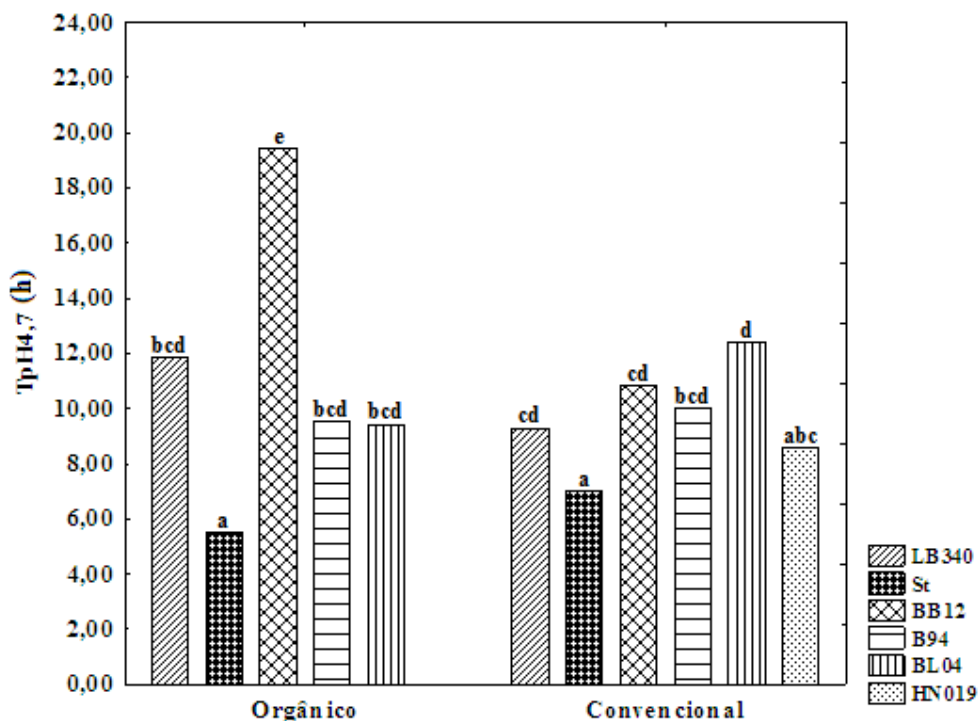


Figura 11. Tempo de Fermentação ($t_{pH4,7}$) de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340), *Streptococcus thermophilus* (St) e de quatro cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12, B94, BL04 e HN019) como culturas puras em leites orgânico e convencional. Médias ($n = 2$) com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

* A cultura HN019 não atingiu o pH 4,7 em leite orgânico.

5.3.2. Pós-acidificação, acidez e lactose

Os resultados de pós-acidificação (pH), acidez e lactose dos leites fermentados pelas cepas de bifidobactérias e pelas culturas do iogurte em cultura pura em leites orgânico e convencional após 24h de armazenamento a 4 °C estão mostrados na Tabela 9.

Os valores de pH variaram entre as cepas de bifidobactérias com diferenças estatísticas significativas entre si. Entretanto, as mesmas culturas não apresentaram diferenças de pós-acidificação em função da matéria-prima empregada. Observa-se que o leite fermentado produzido com a cepa HN019 apresentou valores de pós-acidificação próximos ao pH de parada. O pH obtido pelas culturas St e LB340 foi muito semelhantes em ambos os leites.

Tabela 9. Comparação da pós acidificação (pH), acidez e lactose de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340) e *Streptococcus thermophilus* (St) e de quatro cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12, B94, BL04 e HN019) como culturas puras

Leite	Produto	Cultura	Acidez (g.100g ⁻¹)	Lactose (g.100g ⁻¹)	pH
Orgânico	LF	LB340	0,80±0,01 ^{cd}	4,46±0,02 ^{ab}	4,35±0,03 ^a
	LF	St	0,81±0,02 ^{cd}	4,45±0,09 ^{ab}	4,46±0,00 ^{abcd}
	LF	BB12	0,85±0,02 ^d	4,42±0,08 ^a	4,43±0,13 ^{abc}
	LF	B94	0,68±0,02 ^{bc}	4,59±0,07 ^{bc}	4,61±0,02 ^d
	LF	BL04	0,64±0,01 ^b	4,68±0,11 ^c	4,41±0,06 ^{ab}
	LF	HN019	0,49±0,09 ^a	5,29±0,07 ^e	5,06±0,15 ^e
Convencional	LF	LB340	0,76±0,05 ^{bcd}	4,62±0,02 ^{bc}	4,49±0,10 ^{abcd}
	LF	St	0,76±0,00 ^{bcd}	4,40±0,06 ^a	4,37±0,00 ^{ab}
	LF	BB12	0,80±0,01 ^{cd}	4,41±0,02 ^a	4,46±0,01 ^{abcd}
	LF	B94	0,86±0,06 ^d	4,53±0,04 ^{abc}	4,59±0,01 ^{cd}
	LF	BL04	0,78±0,02 ^d	4,42±0,12 ^a	4,53±0,03 ^{bcd}
	LF	HN019	0,83±0,02 ^d	4,65±0,03 ^c	4,53±0,02 ^{bcd}

Legenda: LF = leite fermentado; Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Os valores de ácido láctico encontrados nos leites fermentados orgânicos foram parecidos com os obtidos nos produtos convencionais. O menor teor de ácido láctico foi encontrado para a cepa HN019 (0,49 g.100g⁻¹), em leite orgânico, e o maior para o leite fermentado pela cultura B94, em leite convencional (0,86 g.100g⁻¹).

Teores muito próximos de lactose foram obtidos pelas culturas puras, quando comparadas às mesmas co-culturas; entretanto, as cepas BL04 e HN019, em leite orgânico, não apresentaram teores residuais de lactose satisfatórios. A cepa HN019 não conseguiu reduzir a lactose em ácido láctico, justamente por não ter atingido o pH final de fermentação.

5.3.3. Contagem microbiológica de culturas iniciadoras e de bifidobactérias

A Tabela 10 detalha as contagens microbiológicas das culturas iniciadoras e de bifidobactérias no momento da inoculação no leite (D0) e no produto fermentado após o período de armazenamento de 24 h a 4 °C (D1).

As contagens de *S. thermophilus* apresentaram diferenças significativas em relação ao tipo de leite empregado. *S. thermophilus* apresentou, em D0, 7,93 log₁₀ UFC.mL⁻¹ (leite orgânico) e 7,28 log₁₀ UFC.mL⁻¹ (leite convencional); após 24h de armazenamento, a 4 °C (D1), houve aumento de 1,70 log₁₀ UFC.mL⁻¹ e 2,09 log₁₀ UFC.mL⁻¹, respectivamente. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentou contagem inferior à *S. thermophilus*, sendo, em média, 8,70 log₁₀ UFC.mL⁻¹ em leite fermentado orgânico e 7,64 log₁₀ UFC.mL⁻¹ em convencional (Tabela 10).

Os leites fermentados pelas cepas de bifidobactérias tiveram suas contagens entre 8,69 e 9,66 log₁₀ UFC.mL⁻¹. As contagens de *B. animalis* subsp. *lactis* apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os leites empregados. A maior contagem de bifidobactéria foi de 9,66 log₁₀ UFC.mL⁻¹ para a cultura BB12, em leite orgânico, e 9,35 log₁₀ UFC.mL⁻¹ para a cultura BL04, em leite convencional (Tabela 10).

O aumento médio da contagem de todos os microrganismos do momento da inoculação até o término da fermentação (análise feita após 24 h de armazenamento) nos leites fermentados orgânicos e convencionais foi de 2,01 log₁₀ e 2,17 log₁₀ ciclos, respectivamente. A cultura que apresentou maior crescimento após a fermentação foi B94, para ambos os leites, com aumento de 3,08 log₁₀ (leite orgânico) e 3,16 log₁₀ (leite convencional).

Todos os produtos obtiveram, após um dia da fermentação, contagem microbiológica adequada para considerá-los alimentos funcionais, conforme recomendações de Rybka e

Kailasapathy (1995), Dave e Shah (1997), Kailasapathy e Rybka (1997) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1999) e Oliveira *et al.* (2002).

As contagens de células viáveis de bifidobactérias e *S. thermophilus* foram semelhantes às obtidas por Oliveira *et al.* (2009b); entretanto, a contagem de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi superior às obtidas para o mesmo microrganismo pelos mesmos pesquisadores.

Tabela 10. Contagens da cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340) e *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12, B94, BL04 e HN019) e *S. thermophilus* fermentadas em cultura pura em leite orgânico e convencional após a fermentação e armazenamento por 24 h a 4 °C

Leite	Produto	Cultura	log ₁₀ UFC.mL ⁻¹ D0	log ₁₀ UFC.mL ⁻¹ D1
Orgânico	LF	LB340	6,15±0,21 ^b	8,70±0,26 ^g
	LF	St	7,93±0,04 ^f	9,63±0,16 ^{jk}
	LF	BB12	7,69±0,01 ^{def}	9,66±0,08 ^k
	LF	B94	6,37±0,16 ^b	9,45±0,01 ^{ijk}
	LF	BL04	7,55±0,15 ^{de}	8,69±0,12 ^g
	LF	HN019	7,74±0,04 ^{ef}	9,34±0,06 ^{hij}
Convencional	LF	LB340	5,65±0,07 ^a	7,64±0,05 ^{def}
	LF	St	7,28±0,19 ^c	9,37±0,01 ^{hi}
	LF	BB12	7,42±0,03 ^{cde}	9,25±0,03 ^{hi}
	LF	B94	6,09±0,07 ^b	9,25±0,03 ^{hi}
	LF	BL04	7,19±0,02 ^c	9,35±0,10 ^{hijk}
	LF	HN019	7,36±0,05 ^{cd}	9,13±0,02 ^h

Legenda: LF = leite fermentado; D0 = após inoculação no leite processado; D1 = após o período de fermentação no produto armazenado a 4°C. Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.3.4. Perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado

Os teores de ácidos graxos (%) em leites frescos orgânico e convencional (L) e nos leites fermentados (LF) preparados com quatro cepas de bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340) e *Streptococcus thermophilus* (St) em cultura pura são exibidos na Tabela 11. A composição dos principais ácidos graxos (%) dos produtos analisados encontram-se no Anexo II.

Os teores de AGCC foram 2,58% e 3,53% em leites frescos orgânicos e convencionais, respectivamente. Os teores de AGCC em leites fermentados variaram de 2,59 a 3,43 %, em leites fermentados orgânicos, e de 2,65% a 3,65 %, nos produtos convencionais (i.e., sem diferenças significativas; $P \geq 0,05$). Igual resultado foi obtido para AGCM e AGCL em leites fermentados orgânicos e convencionais (Tabela 11).

O leite fresco orgânico e os leites fermentados orgânicos apresentaram os menores valores de ácidos graxos saturados (64,08% a 67,98%, sem diferenças estatísticas entre os produtos). Os produtos convencionais apresentaram teores de AGS entre 68,40 e 71,56%, isto é, maiores que os obtidos nos produtos orgânicos.

Os teores de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) das amostras foram, em média, 3,61%, sem diferenças significativas. O menor teor de AGMI, isto é, 25,26%, foi encontrado em leite fermentado convencional LB340, com diferença significativa ($P \leq 0,05$), quando comparado com as demais amostras (Tabela 11).

Todos os teores de AGS, AGMI e AGPI em leites orgânico e convencional estão de acordo com os dados relatados por outros autores (ELLIS *et al.*, 2006; PRANDINI *et al.*, 2007; COLLOMB *et al.*, 2008; FANTI *et al.*, 2008).

Os produtos orgânicos apresentaram menores teores de ácidos graxos saturados e maiores teores de ácidos graxos monoinsaturados, quando comparados aos seus equivalentes convencionais; estes dados demonstram qualidade superior nos produtos fermentados orgânicos, tendo em vista que o maior conteúdo de ácidos graxos saturados tem sido relacionado com aumento no colesterol total plasmático, doenças cardíacas e aumento de peso (EBRINGER; FERENCIK; KRAJCOVIC, 2008).

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na concentração de CLA (*cis*-9, *trans*-11) em leite fresco e em leites fermentados provenientes do manejo convencional

(Figura 12). Por outro lado, a maior concentração de CLA (*cis*-9, *trans*-11) foi encontrada no leite fermentado com as culturas BB12 (1,66% \pm 0,01), B94 (1,60% \pm 0,07), BL04 (1,65% \pm 0,04), HN019 (1,49% \pm 0,05) e LB340 (1,63% \pm 0,04) com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) perante todos os produtos convencionais, que apresentaram, em média, teor de CLA de 0,70%. Todos os produtos orgânicos (leite fresco e leites fermentados) apresentaram, em média, teores de CLA semelhantes, sem diferenças estatísticas significativas. Estes resultados confirmam dados previamente obtidos em pesquisas conduzidas com leites, iogurtes e leites fermentados (PRANDINI *et al.*, 2007; COLLOMB *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; MELE *et al.*, 2009; MOLKETIN, 2009).

Foi observado que o teor de CLA (*cis*-9, *trans*-11), em leites fermentados orgânicos, não aumentou em relação ao nível desse ácido graxo antes da fermentação, demonstrando que, possivelmente, a associação de bifidobactérias e lactobacilos com *S. thermophilus* é favorável.

Apesar dos teores de CLA não terem aumentado após a fermentação com as bactérias em cultura pura, todos os produtos orgânicos apresentaram, em média, teor de CLA 2,29 vezes superior aos produtos convencionais.

Tabela 11. Teor de ácidos graxos (%) em leites frescos orgânicos e convencionais (L) e leites fermentados (LF) por *S. thermophilus* (St), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340) e *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12; B94; BL04; HN019)

Leite	Produto	Cultura	AGCC	AGCM	AGCL	AGS	AGMI	AGPI
Orgânico	L	--	2,58±0,50 ^a	9,15±1,24 ^a	88,26±1,74 ^a	64,49±1,19 ^{abc}	31,81±1,05 ^e	3,70±0,15 ^{ab}
	LF	LB340	2,59±0,23 ^a	8,77±0,70 ^a	88,71±0,97 ^a	64,21±1,86 ^{ab}	32,04±0,96 ^e	3,75±0,10 ^{ab}
	LF	St	3,43±0,68 ^a	11,51±2,34 ^a	85,05±2,98 ^a	67,98±3,01 ^{abcdef}	29,04±2,61 ^{abcde}	3,29±0,40 ^{ab}
	LF	BB12	2,92±0,85 ^a	9,73±2,34 ^a	87,59±3,39 ^a	65,13±2,57 ^{abc}	31,15±2,36 ^{de}	3,72±0,21 ^{ab}
	LF	B94	2,88±0,44 ^a	10,43±2,55 ^a	86,69±2,97 ^a	66,28±4,71 ^a	30,17±2,58 ^e	3,55±0,24 ^{ab}
	LF	BL04	2,66±0,23 ^a	8,88±0,51 ^a	88,48±0,73 ^a	64,08±0,69 ^{abcd}	32,13±0,58 ^{cde}	3,79±0,12 ^{ab}
	LF	HN019	3,13±0,37 ^a	11,15±0,96 ^a	85,71±1,27 ^a	66,86±2,64 ^{abcde}	29,73±0,69 ^{bcde}	3,41±0,12 ^{ab}
Convencional	L	--	3,53±0,60 ^a	11,69±2,10 ^a	84,77±2,50 ^a	70,43±4,96 ^{def}	25,93±1,82 ^{ab}	3,64±0,40 ^{ab}
	LF	LB340	3,40±0,74 ^a	12,39±2,83 ^a	84,21±3,47 ^a	71,18±4,10 ^{ef}	25,26±1,16 ^a	3,56±0,54 ^{ab}
	LF	St	3,65±0,45 ^a	11,70±2,06 ^a	84,65±2,45 ^a	70,79±4,62 ^{ef}	25,86±1,45 ^a	3,35±0,51 ^{ab}
	LF	BB12	2,98±0,57 ^a	13,29±2,43 ^a	83,73±2,70 ^a	71,56±3,75 ^f	25,31±1,19 ^a	3,13±0,55 ^a
	LF	B94	3,12±0,36 ^a	10,02±0,69 ^a	86,86±1,06 ^a	69,11±2,20 ^{cdef}	27,03±0,66 ^{abc}	3,86±0,18 ^{ab}
	LF	BL04	3,33±0,91 ^a	10,29±1,80 ^a	86,38±2,70 ^a	68,81±4,57 ^{bcdef}	27,33±1,50 ^{abcd}	3,86±0,26 ^{ab}
	LF	HN019	2,96±0,43 ^a	9,43±1,23 ^a	87,62±1,67 ^a	68,40±3,39 ^{abcdef}	27,64±1,55 ^{abcd}	3,97±0,32 ^b

Legenda: AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; AGCM = ácidos graxos de cadeia média; AGCL = ácidos graxos de cadeia longa; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poliinsaturados. Médias (n = 4) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

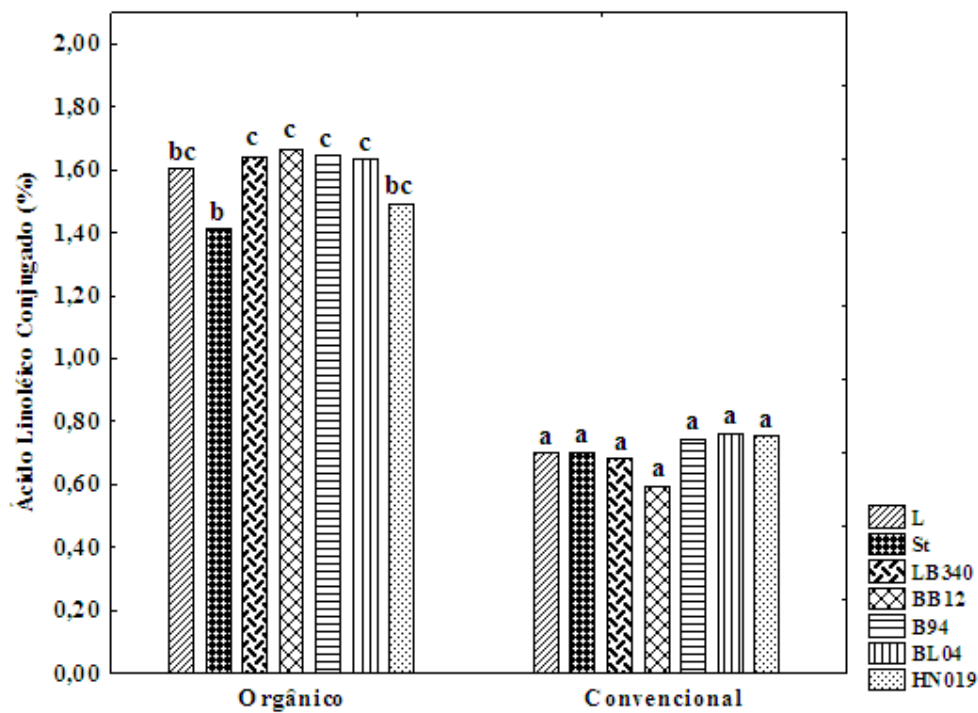


Figura 12. Ácido linoléico conjugado (CLA) em leites frescos orgânicos e convencionais (L) e leites fermentados por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340), *Streptococcus thermophilus* (St) e de quatro cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites orgânico e leite convencional. Médias ($n = 4$) com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

5.3.5. Perfil de textura

A curva típica da análise do perfil de textura dos leites fermentados por bifidobactérias em cultura pura é mostrada na Figura 13. Os produtos convencionais apresentaram maior firmeza, maior consistência e maior valor de *breaking point* com diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$) quando comparados com os orgânicos. A cepa BB12, em leite orgânico, devido ao seu longo tempo de fermentação, apresentou parâmetros de textura semelhantes aos obtidos nos produtos convencionais (DAMIN *et al.*, 2008) (Tabela 12).

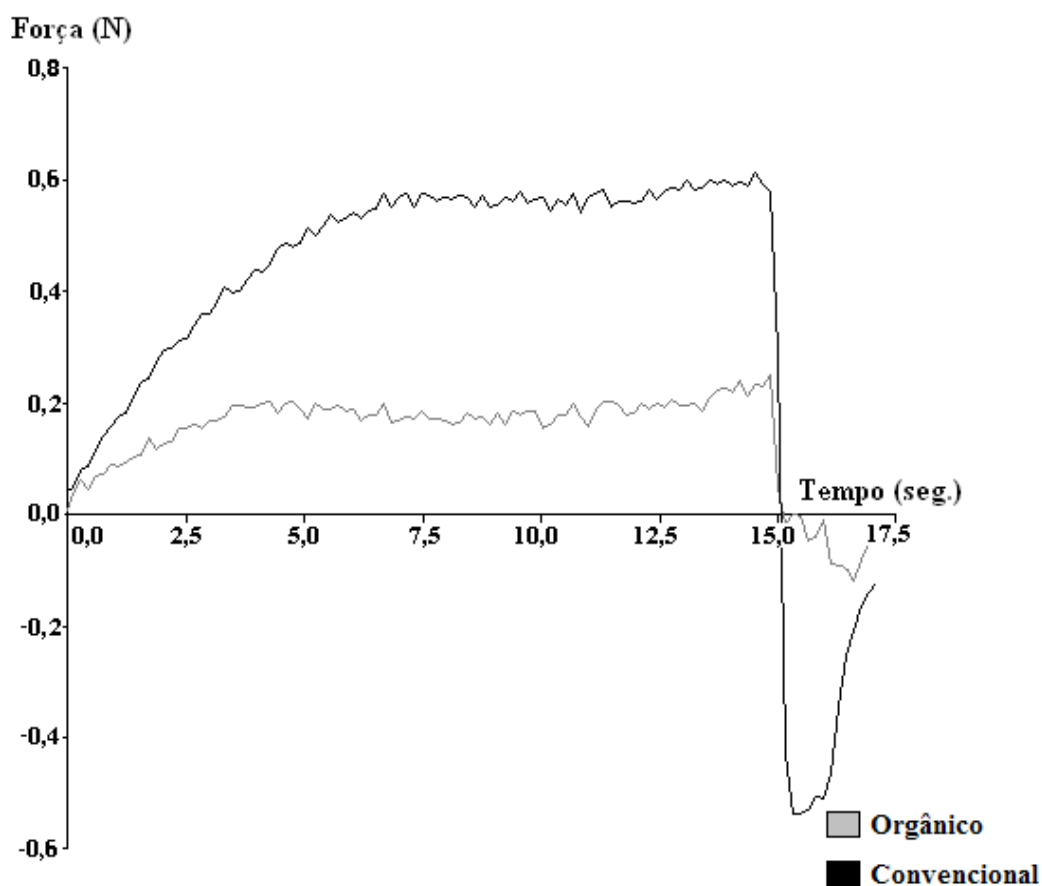


Figura 13. Perfil de textura de leites orgânico e convencional fermentados por bifidobactérias em cultura pura

Tabela 12. Parâmetros de textura de leites fermentados (LF) orgânicos e convencionais preparados com culturas puras de diferentes microrganismos

Leite	Produto	Cultura	Firmeza (N)	Consistência (N.s)	B.P. (N)
Orgânico	LF	LB340	0,24±0,02 ^a	2,95±0,08 ^{ab}	0,23±0,02 ^{ab}
	LF	St	0,30±0,01 ^{ab}	3,56±0,06 ^b	0,22±0,08 ^{ab}
	LF	BB12	0,51±0,09 ^{cd}	5,44±0,33 ^c	0,27±0,14 ^{ab}
	LF	B94	0,19±0,01 ^a	2,36±0,05 ^a	0,16±0,04 ^a
	LF	BL04	0,32±0,01 ^{ab}	3,61±0,09 ^b	0,23±0,04 ^{ab}
	LF	HN019	0,22±0,03 ^a	2,39±0,26 ^a	0,20±0,03 ^{ab}
Convencional	LF	LB340	0,45±0,07 ^{bc}	4,97±0,90 ^c	0,27±0,11 ^{ab}
	LF	St	0,66±0,11 ^d	6,86±0,88 ^e	0,48±0,09 ^c
	LF	BB12	0,52±0,06 ^{cd}	5,71±0,43 ^{cd}	0,38±0,09 ^{bc}
	LF	B94	0,50±0,06 ^{cd}	5,66±0,44 ^c	0,29±0,10 ^{abc}
	LF	BL04	0,52±0,17 ^{cd}	5,47±0,81 ^c	0,30±0,12 ^{abc}
	LF	HN019	0,63±0,15 ^d	6,67±0,41 ^{de}	0,28±0,18 ^{ab}

Legenda: B.P. = *breaking point*; N = newtons; N.s = newtons por segundo. Médias (n = 6) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A firmeza variou de 0,19 a 0,51 N, para os produtos orgânicos, e de 0,45 a 0,66 N, para os produtos preparados com leite convencional. Nota-se que as culturas que proporcionaram a maior firmeza foram BB12 e BL04, em leite orgânico, e St e HN019, para leite convencional.

Os valores de consistência dos produtos convencionais foram semelhantes aos obtidos em co-cultura (Tabela 7) nos produtos orgânicos, com diferenças significativas entre as culturas. A cultura HN019 apresentou o maior valor de consistência em leite convencional; entretanto, a mesma cultura apresentou consistência muito inferior em leite orgânico; esse

fato está relacionado com a fermentação dessa bactéria em leite orgânico, que não foi capaz de atingir o pH necessário para que ocorresse a formação do gel, ou seja, o ponto isoeletrico da caseína não foi alcançado.

O maior valor de *breaking point* foi encontrado nos leites fermentados pela cultura St em leite convencional, apontando para a possibilidade de produção de exopolissacarídeo por essa cepa (LAMMERS *et al.*, 2003).

Como esperado, os produtos resultantes da fermentação de culturas puras apresentaram parâmetros de textura com valores mais baixos quando comparados aos produtos fermentados em co-cultura com *S. thermophilus*.

5.4. Comparação do perfil tecnológico de cepas de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)

A comparação do perfil tecnológico de cepas de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura), simultaneamente, foi conseguida através de análise de variância (ANOVA), considerando os parâmetros cinéticos de acidificação e contagem de bifidobactérias após a fermentação. A pós-acidificação, a textura e o perfil de ácidos graxos e CLA do produto final foram também confrontados a fim de se verificar, de forma geral, os efeitos simultâneos estudados.

A ANOVA apresentada na Tabela 13 mostra claramente os efeitos significativos ($P \leq 0,05$) da cultura, da composição destas e do leite na cinética de acidificação para os parâmetros V_{\max} , $t_{V\max}$, $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,7}$. Não se obteve resultado significativo para os efeitos cultura e composição no valor de pH no qual a velocidade máxima foi atingida ($P \geq 0,05$). Os resultados evidenciam que a co-cultura das bifidobactérias com *S. thermophilus* diminui o tempo para o leite atingir pH 5,0 (Figura 14) e pH4,7 (Figura 15), sendo que a cinética de acidificação é cepa-dependente. O leite orgânico fermentado por bifidobactérias em cultura pura apresenta tempo de fermentação ($t_{pH4,7}$) superior ao convencional, de acordo com a cepa. Contrariamente, o leite orgânico fermentado por co-culturas de bifidobactérias e *S. thermophilus* apresenta, em média, tempo de fermentação similar ao convencional (Figura 15). As bifidobactérias requerem mais tempo que as culturas do iogurte para atingir pH4,7; a cultura BB12 em cultura pura foi considerada, em média, a mais lenta.

Tabela 13. Resultados da ANOVA para os parâmetros cinéticos (V_{\max} , $t_{V_{\max}}$, $pH_{V_{\max}}$, $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,7}$) de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)

Variável	Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P
V_{\max}	Cultura	183,00	3	61,00	45,80	0,00*
	Cultura x Composição	253,61	3	84,54	63,47	0,00*
	Cultura x Leite	154,15	3	51,38	38,58	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	44,34	3	14,78	11,10	0,00*
	Erro	25,30	19	1,33		
$t_{V_{\max}}$	Cultura	6,73	3	2,24	34,27	0,00*
	Cultura x Composição	14,47	3	4,82	73,71	0,00*
	Cultura x Leite	27,16	3	9,05	138,38	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	21,01	3	7,00	107,04	0,00*
	Erro	1,24	19	0,07		
$pH_{V_{\max}}$	Cultura	0,32	3	0,11	5,77	0,00*
	Cultura x Composição	0,02	3	0,01	0,43	0,73
	Cultura x Leite	0,28	3	0,09	5,02	0,01*
	Cultura x Composição x Leite	0,53	3	0,18	9,57	0,00*
	Erro	0,35	19	0,02		
$t_{pH5,0}$	Cultura	17,92	3	5,97	17,44	0,00*
	Cultura x Composição	25,29	3	8,42	24,61	0,00*
	Cultura x Leite	32,52	3	10,84	31,65	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	23,21	3	7,74	22,59	0,00*
	Erro	6,50	19	0,34		
$t_{pH4,7}$	Cultura	51,51	3	17,17	193,61	0,00*
	Cultura x Composição	50,89	3	16,96	191,27	0,00*
	Cultura x Leite	60,63	3	20,21	227,90	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	44,17	3	14,72	166,01	0,00*
	Erro	1,68	19	0,09		

Legenda: SQ: = soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = estatística de Fisher. *: Significativo ao nível de $P \leq 0,05$.

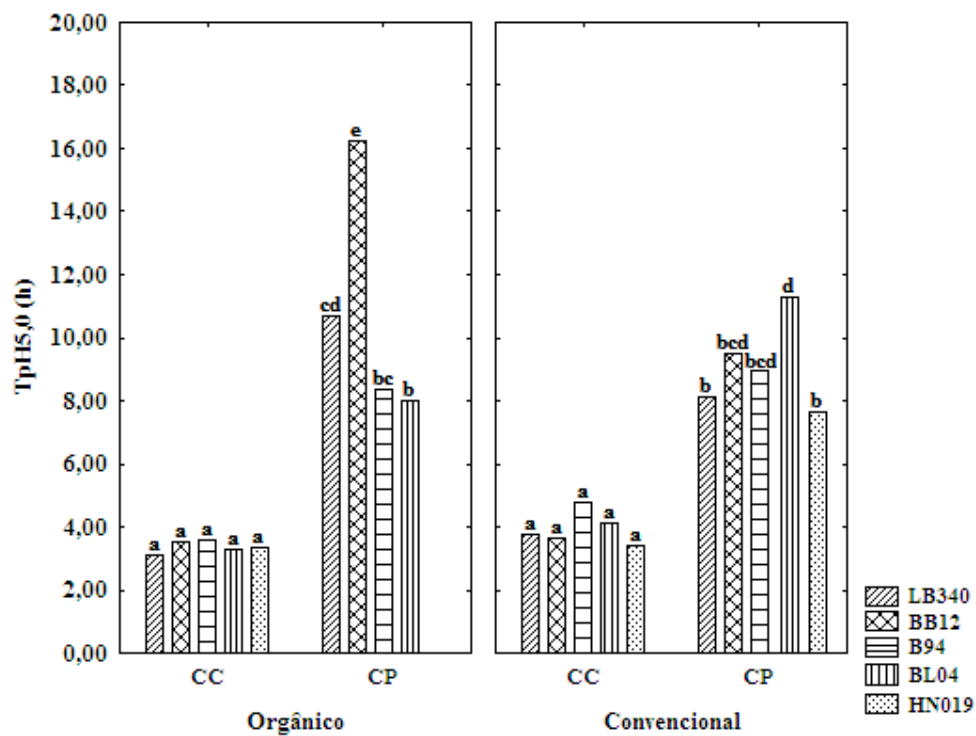


Figura 14. Tempo para atingir pH5,0 de *L. bulgaricus* (cepa LB340) e de bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites fermentados a 42 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

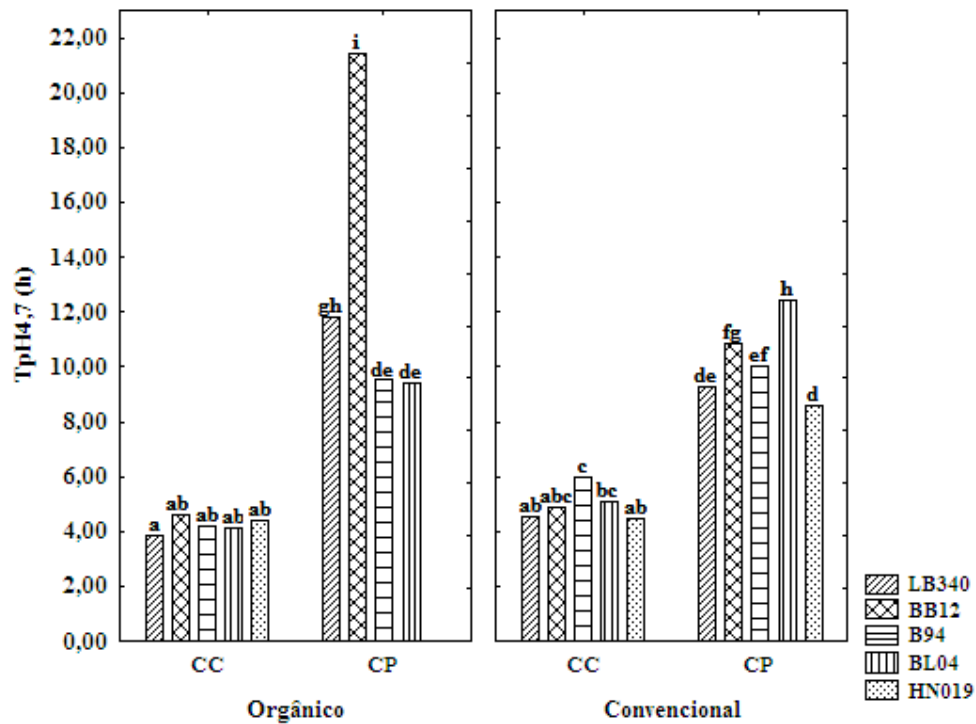


Figura 15. Tempo para atingir pH4,7 de *L. bulgaricus* (cepa LB340) e de bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites fermentados a 42 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

Após 24 h da fermentação o valor de pH dos leites fermentados foi de 4,43 (BB12) a 4,62 (HN019). O valor de pH do leite fermentado por LB340 foi de $4,47 \pm 0,10$, decrescendo, em média, 0,3 unidades de pH. A origem do leite e a composição da cultura não influenciaram, em média, a pós-acidificação (pH dos leites fermentados após 24h de armazenamento a 4 °C foi ~4,5) (Tabela 14 e Figura 16).

Tabela 14. Resultados da ANOVA para a pós-acidificação de leites fermentados por bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P
Cultura	0,37	4	0,09	21,50	0,00*
Composição da cultura	0,07	1	0,07	16,00	0,00*
Leite	0,04	1	0,04	9,50	0,00*
Cultura x Composição	0,51	4	0,13	29,60	0,00*
Cultura x Leite	0,31	4	0,08	18,10	0,02*
Composição x Leite	0,001	1	0,001	0,300	0,591
Cultura x Composição x Leite	0,31	4	0,08	18,00	0,00*
Erro	0,256	60	0,004		

Legenda: SQ = soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = estatística de Fisher. *: Significativo ao nível de $P \leq 0,05$.

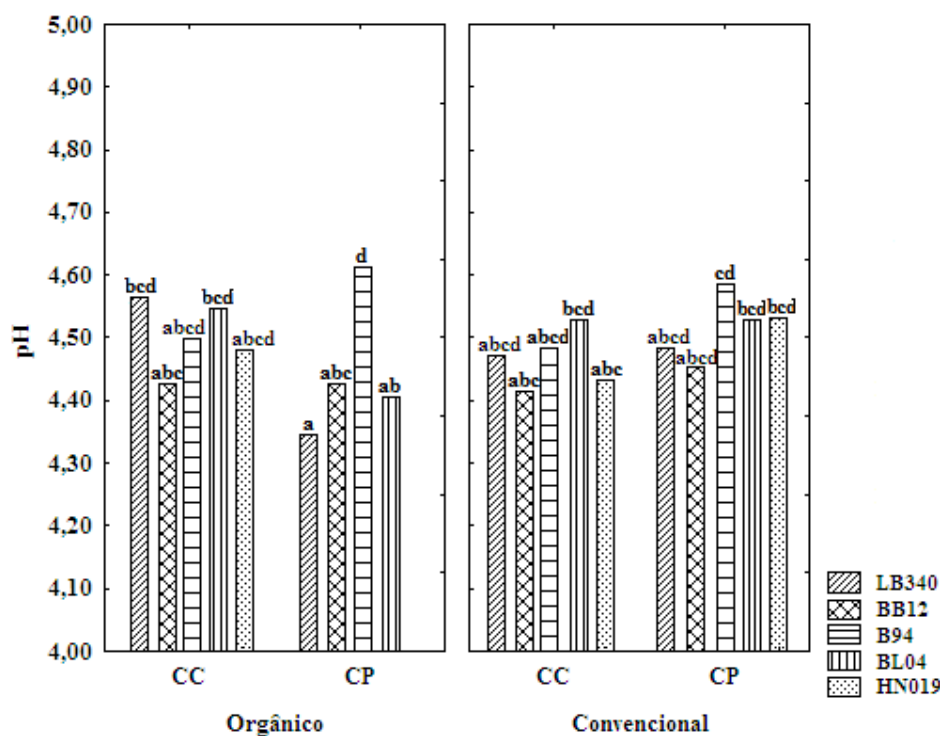


Figura 16. Pós-acidificação de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

Na Tabela 15, apresenta-se o resultado da ANOVA para a contagem de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura), todos os resultados mostraram-se significativos ($P \leq 0,05$). As contagens das bifidobactérias variaram de $8,86 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ (HN019) a $9,22 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ (BB12), sendo superiores às contagens de *L. bulgaricus* (média $8,28 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$). Estas estão de acordo com o requerido para o produto probiótico. A composição da cultura influenciou a contagem, sendo, em cultura pura, ligeiramente superior ($\sim 0,5$ ciclo log), enquanto o tipo de leite influenciou pouco na contagem (Figura 17).

Tabela 15. Resultados da ANOVA para a contagem de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P
Cultura	4,46	4	1,14	67,40	0,00*
Composição da cultura	2,85	1	2,85	172,10	0,00*
Leite	0,24	1	0,24	14,50	0,00*
Cultura x Composição	1,41	4	0,35	21,30	0,00*
Cultura x Leite	0,26	4	0,07	4,00	0,02*
Composição x Leite	1,07	1	1,07	64,90	0,00*
Cultura x Composição x Leite	0,60	4	0,15	9,10	0,00*
Erro	0,33	20	0,18		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F: estatística de Fisher. *: Significativo ao nível de $P \leq 0,05$.

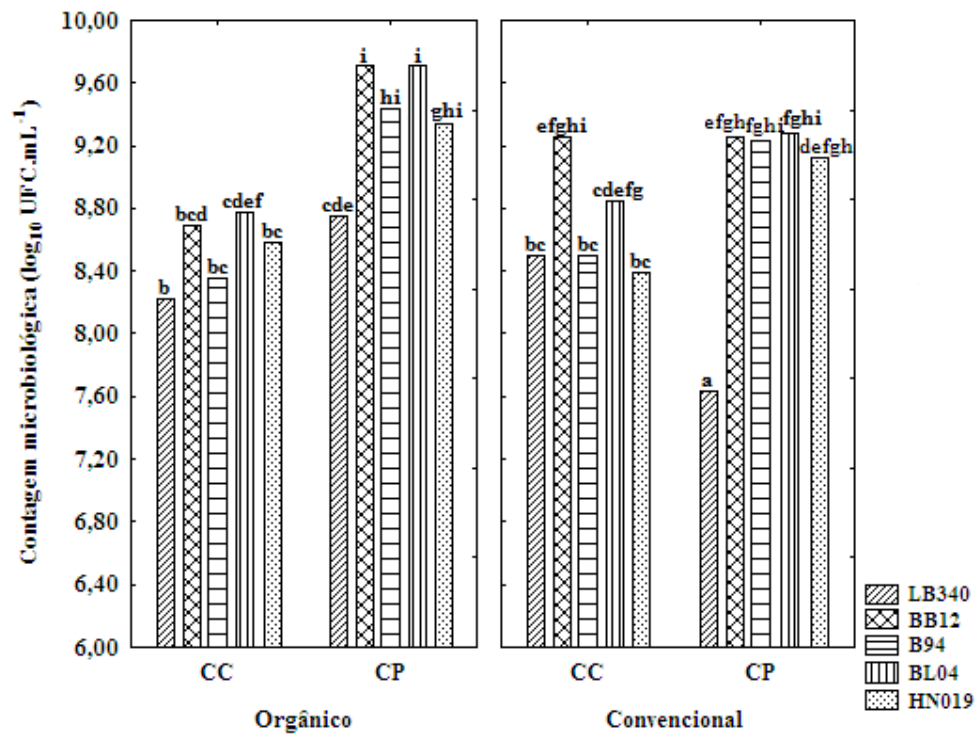


Figura 17. Contagem de *L. bulgaricus* (cepa LB340) e de bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) em leites fermentados após 24h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

Estudou-se, também, o efeito simultâneo das diferentes culturas (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura) no perfil de ácidos graxos e CLA de iogurtes e leites fermentados preparados. A Tabela 16 ilustra os resultados da ANOVA, mostrando a significativa influência de alguns destes fatores e suas interações no conteúdo de CLA, de AGS e de AGMI, ($P \leq 0,05$). Para os teores de CLA, não obtiveram efeitos significativos das interações entre as variáveis cultura e composição da cultura com o tipo de leite empregado simultaneamente. Para os AGS, não foram significativas as variáveis composição da cultura e a interação da mesma variável com o tipo de cultura, assim como a composição da cultura e a interação cultura-leite não influenciaram o teor de AGMI nos iogurtes e leites fermentados.

Tabela 16. Resultados da ANOVA para resultados de perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado de leites fermentados probióticos em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)

Variável	Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P
CLA	Cultura	0,09	4	0,02	2,49	0,05
	Composição da cultura	1,28	1	1,28	135,37	0,00*
	Leite	11,10	1	11,10	1.173,83	0,00*
	Cultura x Composição	0,03	4	0,01	0,93	0,45
	Cultura x Leite	0,33	4	0,08	8,87	0,00*
	Composição x Leite	0,53	1	0,53	56,54	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	0,06	4	0,01	1,50	0,21
	Erro	0,57	60	0,01		
AGS	Cultura	35,90	4	9,00	3,50	0,01*
	Composição da cultura	0,50	1	0,50	0,20	0,65
	Leite	121,60	1	121,60	47,60	0,00*
	Cultura x Composição	16,70	4	4,20	1,60	0,18
	Cultura x Leite	41,60	4	10,40	4,10	0,00*
	Composição x Leite	88,20	1	88,20	34,50	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	27,50	4	6,90	2,70	0,04*
	Erro	153,20	60	2,60		
AGMI	Cultura	28,38	4	7,09	4,13	0,00*
	Composição da cultura	3,74	1	3,74	2,18	0,14
	Leite	96,43	1	96,43	56,24	0,00*
	Cultura x Composição	26,13	4	6,53	3,81	0,01*
	Cultura x Leite	10,62	4	2,65	1,55	0,20
	Composição x Leite	117,93	1	117,93	68,78	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	52,13	4	13,03	7,60	0,00*
	Erro	102,87	60	1,71		

Legenda: SQ = soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = estatística de Fisher; CLA = ácido linoléico conjugado; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados. *: Significativo ao nível de $P \leq 0,05$.

Na Figura 18 observa-se a expressiva presença de CLA nos leites fermentados, com valores médios compreendidos entre 1,29 e 1,33%, quando se utilizaram BB12 e BL04, respectivamente. Estes valores foram superiores aos obtidos para os iogurtes empregando-se a cultura LB340. A utilização da co-cultura estimulou significativamente a produção de CLA

($P \leq 0,05$). O leite orgânico resultou, em média, aumento de 55% em CLA nos leites fermentados.

O teor de AGS variou, em média, de 67% (iogurte preparado com LB340) e 68,83% (leite fermentado preparado com BB12) (Figura 19). A composição da cultura teve pequena influência nos AGS, enquanto o leite convencional resultou, em média, em produto com teor significativamente maior (~68,85%).

A Figura 20 mostra o pequeno efeito da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura) sobre o teor de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI). Os valores foram, em média, de $28,60 \pm 2,35$ %, com ligeiro aumento nos produtos orgânicos.

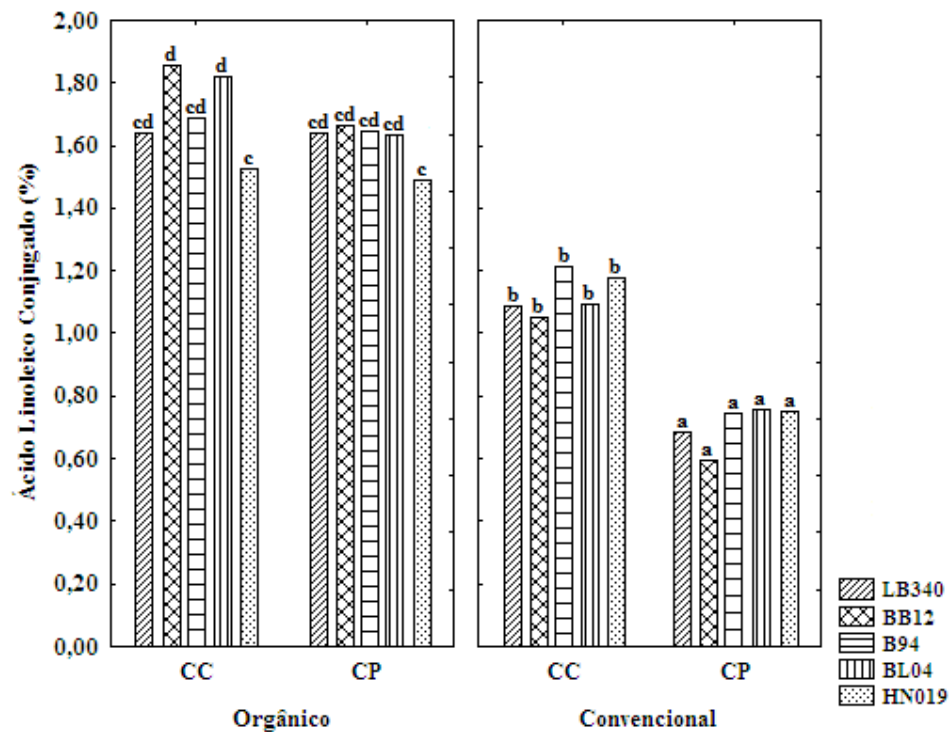


Figura 18. Conteúdo em ácido linoléico conjugado (CLA) de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

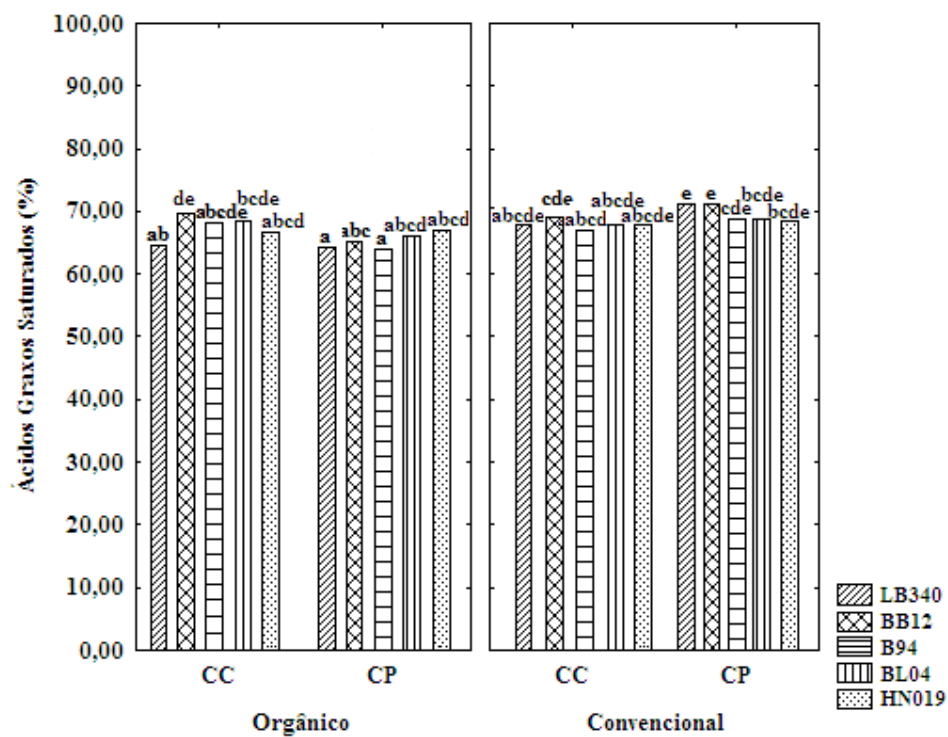


Figura 19. Conteúdo em ácidos graxos saturados (AGS) de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

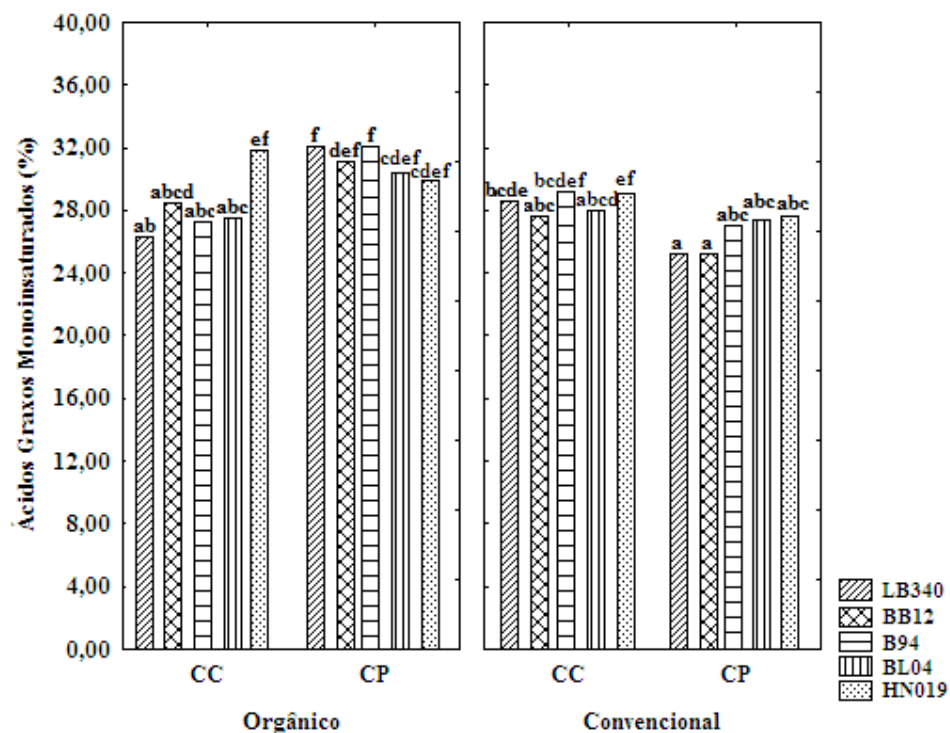


Figura 20. Conteúdo em ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4°C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

Os teores de AGPI, AGCC, AGCM e AGCL determinados nos iogurtes e nos leites fermentados não sofreram efeitos significativos da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura). Os teores de AGPI e de ácidos graxos de AGCC, AGCM e AGCL foram, respectivamente, $3,62 \pm 0,37$ %, $3,03 \pm 0,61$ %, $10,27 \pm 1,71$ % e $86,69 \pm 2,14$ %.

Finalmente, a firmeza e a consistência dos leites fermentados por bifidobactérias foram afetadas pelo efeito simultâneo da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura), $P \leq 0,05$, como pode ser visto na Tabela 17. Entretanto, estes efeitos simultâneos não afetaram significativamente o *breaking point* dos leites fermentados ($P \geq 0,05$).

Tabela 17. Resultados da ANOVA para a os resultados de textura (*breaking point*, firmeza e consistência) de leites fermentados probióticos em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura)

Variável	Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P
<i>Breaking point</i>	Cultura	0,48	4	0,12	11,32	0,00*
	Composição da cultura	10,17	1	10,17	964,41	0,00*
	Leite	5,50	1	5,50	521,52	0,00*
	Cultura x Composição	0,41	4	0,10	9,63	0,00*
	Cultura x Leite	0,17	4	0,04	4,15	0,00*
	Composição x Leite	3,54	1	3,54	335,79	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	0,09	4	0,02	2,12	0,08
	Erro	1,05	100	1,05		
Firmeza	Cultura	1,14	4	0,28	32,13	0,00*
	Composição da cultura	0,58	1	10,58	1.190,26	0,00*
	Leite	0,33	1	10,33	1.161,40	0,00*
	Cultura x Composição	0,60	4	0,15	27,00	0,00*
	Cultura x Leite	0,64	4	0,16	18,14	0,00*
	Composição x Leite	3,79	1	3,79	426,80	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	0,36	4	0,09	10,19	
	Erro	0,89	100	0,01		
Consistência	Cultura	147,19	4	36,80	44,77	0,00*
	Composição da cultura	1.586,97	1	1.586,97	1.930,96	0,00*
	Leite	1.309,95	1	1.309,95	1.593,90	0,00*
	Cultura x Composição	93,98	4	23,49	28,59	0,00*
	Cultura x Leite	84,74	4	21,85	25,77	0,00*
	Composição x Leite	545,50	1	545,50	663,74	0,00*
	Cultura x Composição x Leite	43,89	4	10,97	13,35	0,00*
	Erro	82,19	100	0,82		

Legenda: SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = estatística de Fisher. *: Significativo ao nível de $P \leq 0,05$.

A força para romper o gel dos leites fermentados medida através do *breaking point* variou, em média, de 0,46 a 0,63 N, segundo a cultura empregada. A cultura pura resultou em

um gel menos firme, com *breaking point* 0,26 N, em média, enquanto a associação das bifidobactérias com *S. thermophilus* formou gel mais firme, com *breaking point*, em média, quatro vezes superior. O *breaking point* decorrente do uso de leite orgânico como matéria-prima foi significativamente inferior aquele obtido com leite convencional (Figura 21).

A Figura 22 mostra a firmeza obtida para iogurte e leites fermentados por diferentes cepas de bifidobactérias após um dia de armazenamento a 4°C. Observa-se que a firmeza, em média, variou de 0,68 a 0,83 N para as culturas B94 e HN019, respectivamente, superiores à firmeza obtida para o iogurte (0,55 N). A firmeza foi significativamente maior quando se empregou a co-cultura e o leite convencional ($P \leq 0,05$).

A consistência dos leites fermentados foi, em média, de 7,57 N.s (BL04) a 9,61 N.s (HN019), significativamente superior aquela obtida, em média, para o iogurte (6,48 N.s) (Figura 23). Da mesma forma que a firmeza, a consistência foi significativamente maior quando se empregou a co-cultura e o leite convencional ($P \leq 0,05$).

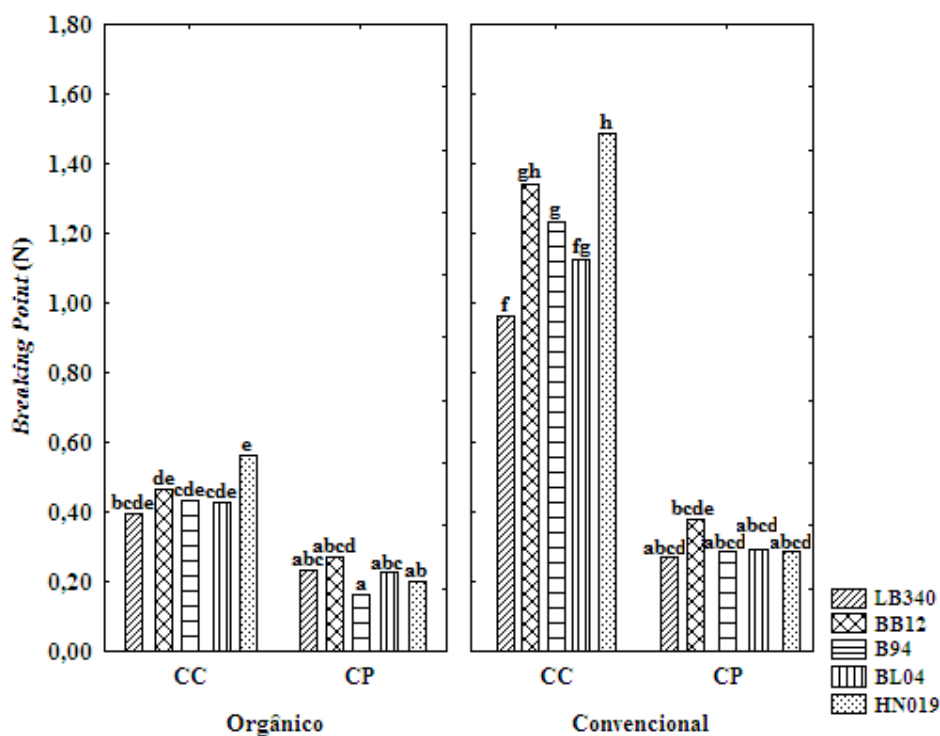


Figura 21. *Breaking point* de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

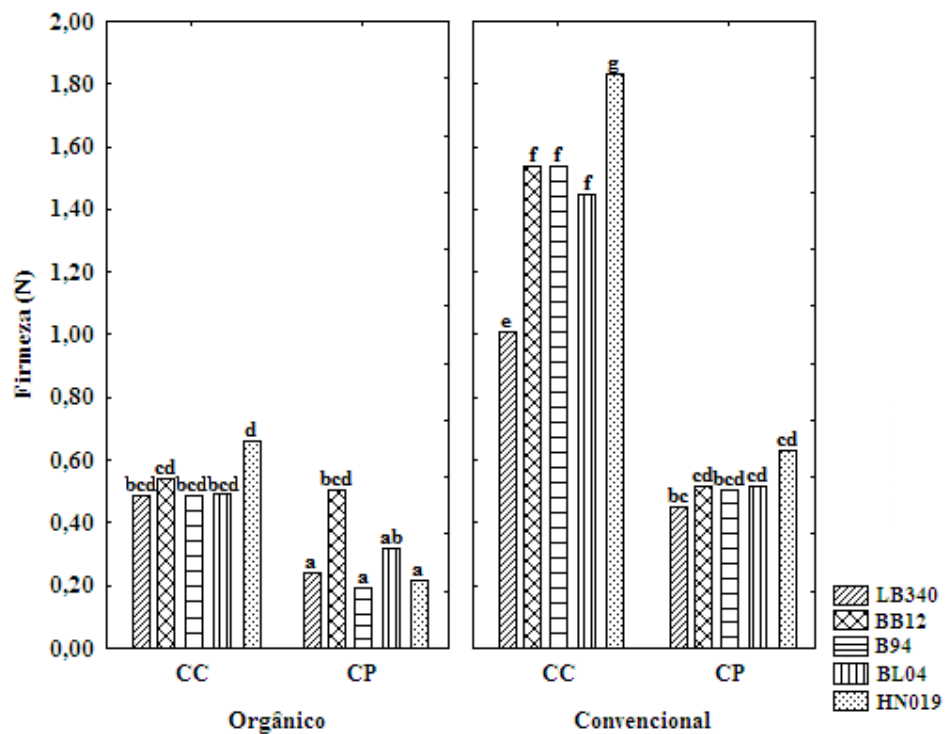


Figura 22. Firmeza de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

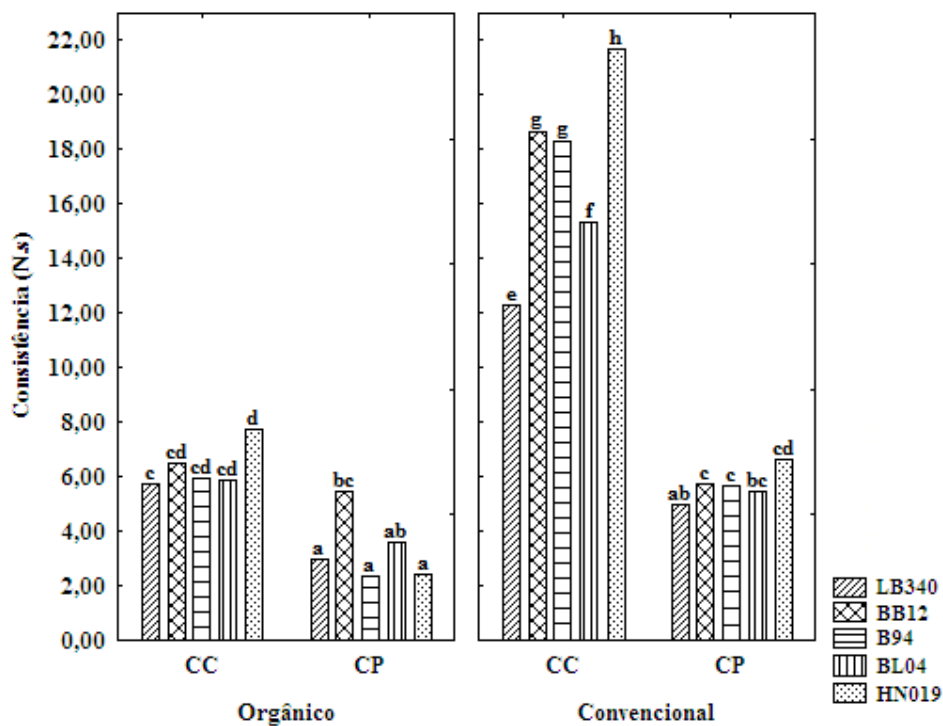


Figura 23. Consistência de leites fermentados por *L. bulgaricus* cepa LB340 e de leites fermentados por bifidobactérias (BB12, B94, BL04 e HN019) após 24 h de armazenamento a 4 °C em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (CC = co-cultura e CP = cultura pura)

Em relação a comparação do perfil tecnológico de cepas de bifidobactérias em função da cultura (LB340, BB12, B94, BL04 e HN019), do leite (orgânico ou convencional) e da composição da cultura (co-cultura e cultura pura), não foi possível estabelecer comparações com outros estudos, tendo em vista que a literatura não disponibiliza de dados semelhantes.

6. CONCLUSÕES

- O leite orgânico apresentou maior teor de proteína, enquanto no convencional maiores teores de lactose e de gordura foram observados. Os teores de Ca e Zn foram maiores no leite fresco convencional; Mg e Cu foram similares em ambos os tipos de leite, mas o conteúdo em Fe foi superior em leite orgânico.
- O perfil de acidificação foi significativamente influenciado pelo tipo de leite (orgânico ou convencional), pela cepa de bifidobactérias utilizadas e pela composição da cultura. O leite fermentado por bifidobactérias em cultura pura apresentou tempo de fermentação superior ao obtido pelas mesmas em co-cultura com *S. thermophilus*; em co-cultura o tempo de fermentação do leite orgânico foi similar ao convencional. As bifidobactérias requerem mais tempo que as culturas do iogurte para atingir o pH de parada da fermentação. A cultura pura BB12 foi considerada a mais lenta.
- As contagens de diferentes cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* foram superiores a 8,86 \log_{10} UFC.mL⁻¹; a composição da cultura influenciou a contagem, sendo ligeiramente superior em cultura pura. O tipo de leite não exerceu muita influência sobre a contagem dos probióticos.
- A cultura e sua composição, simultaneamente, não afetaram o teor de AGS e de AGMI nos iogurtes e leites fermentados. A composição da cultura teve pequena influência nos AGS, enquanto o leite convencional resultou, em média, em produto com teor significativamente maior de AGS (~68,85%). A utilização das co-culturas estimulou significativamente a produção de CLA ($P \leq 0,05$). O leite orgânico empregado como matéria-prima resultou em leite fermentado com aumento médio de 55% no teor de CLA. Os teores de AGPI e os AGCC, AGCM e AGCL, determinados nos iogurtes e nos leites fermentados, não sofreram efeitos significativos da cultura, do leite e da composição da cultura.
- A firmeza e a consistência dos leites fermentados por bifidobactérias foram afetadas pelo efeito simultâneo da cultura, do leite e da composição da cultura. Entretanto, estes efeitos simultâneos não afetaram significativamente o *breaking point* dos leites fermentados. A cultura pura resultou em gel menos firme, sendo que a firmeza foi significativamente maior quando se empregaram a co-cultura e o leite convencional.

- Os resultados deste estudo permitem propor o leite orgânico como potencial matéria-prima para a fabricação de leites fermentados probióticos, pois apresenta perfil tecnológico adequado e características nutricionais evidenciadas, principalmente pelos maiores teores de ácido linoléico conjugado. Entretanto, as características de textura requerem avanços tecnológicos para a fabricação de leites fermentados mais firmes. Finalmente, a produção de leite orgânico deve ser incentivada para que haja redução de custos, bem como deve ser implantada a inclusão da homogeneização no processo de beneficiamento.

7. SUGESTÕES

Este trabalho abre uma nova linha de pesquisa sobre leites fermentados probióticos utilizando leite orgânico como matéria-prima. As sugestões para próximos trabalhos incluem, entre outras:

- Realizar análise sensorial dos leites fermentados contendo *Bifidobacterium animalis*.
- Estudar a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* durante todo o período de armazenamento do produto.
- Estudar a resistência e a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* ao duplo estresse (frio e ácido).
- Compreender os mecanismos de degradação do estado fisiológico de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ao duplo estresse (frio e ácido), em relação ao teor de ácido linoléico conjugado do leite, em vista de melhorar a sua estabilidade em condições deletérias.
- Identificar os mecanismos fisiológicos que originam os fenômenos de degradação celular, consecutivos ao duplo estresse (frio e ácido).
- Estudar os efeitos da concentração em ácido linoléico conjugado (CLA) no crescimento de *Bifidobacterium*, mas também na sobrevivência ao estresse (frio e ácido).
- Avaliar o potencial de *Bifidobacterium sp* em aumentar o teor de CLA, através da biotransformação a partir da adição de ácido linoléico livre, óleo de girassol e lipase solúvel, nos leites orgânicos.

8. REFERÊNCIAS

ACKMAN, R.G. Application of gas liquid chromatography to lipid separation and analysis: qualitative and quantitative analysis. In: CHOW, C.K. ed. *Fatty acids in foods and their health implications*. Boca Raton: CRC Press; USA, 2007, p.47-62.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. *Resolução RDC n.2, de 07 de janeiro de 2002*. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1567&word>. Acesso em: 24 jan. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *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.

AKALIN, A.S.; TOKUSOGLU, Ö.; GÖNÇ, S.; AYCAN, S. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*, v.17, p.1089-1095, 2007.

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN, T.; MATTILA, T.; WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.351-354, 1999.

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.

ALONSO, L.; CUESTA, E.P.; GILLILAND, S.E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1941-1946, 2003.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign: AOCS, 1997. [Method Ce 1-62: fatty acid composition by gas chromatography, in Official Methods and Recommended Practices of the AOCS].

AMROUCHE, T. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur de bifidobactéries: analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués / Tahar Amrouche. Québec: Université Laval, 2005. 175p.

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

ARUNACHALAM, K.; GILL, H.S.; CHANDRA, R.K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *European Journal of Clinical Nutrition*, v.54, p.1-5, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000. [Method 965.09. 968.08. 985.35].

BÉAL, C.; LOUVET, P.; CORRIEU, G. Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.32, p.148–154, 1989.

BENKOUIDER, C. The world's emerging markets. *Functional Foods and Nutraceuticals*, 2005. Disponível em: <http://www.ffnmag.com/NH/ASP/strArticleID/770/strSite/FFNSite/articleDisplay.asp>. Acesso em: 14 dez. 2008.

BERGAMO, P.; FEDELE, E.; IANNIBELLI, L.; MARZILLO, G. Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry*, v.82, p.625-631, 2003.

BIAVATI, B.; VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; BOTTAZZI, V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, v.50, p.117-131, 2000.

BISIG, W.; EBERHARD, P.; COLLOMB, M.; REHBERGER, B. Influence of processing on the fatty acid composition and the content of conjugated linoleic acid in organic and conventional dairy products: a review. *Lait*, v.87, p.1-19, 2007.

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.

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J.A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *Journal of Nutrition*, v.130, p.2943-2948, 2000.

BOLETIM TÉCNICO LAFTI[®] B94 DSM Food Specialities.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. Sislegis. *Decreto n.6323, de 27 de dezembro de 2007*. Regulamenta a Lei n.10831 de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18357&word>. Acesso em: 10 maio 2008.

BRITO, M.A.; BRITO, J.R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. Composição do leite. In: EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. Agronegócio do Leite. Pré-produção. Qualidade e Segurança. *Qualidade. Composição*. Brasília: Agência de Informação Embrapa, 2005. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.htm. Acesso em: 14 set 2007.

BUTLER, G.; NIELSEN, J.H.; SLOTS, T.; SEAL, C.; EYRE, M.D.; SANDERSON, R.; LEIFERT, C. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and

low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.88, p.1431-1441, 2008.

CACHON, R.; JEANSON, S.; ALDARF, M.; DIVIES, C. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, v.82, p.281-288, 2002.

CAMILLERI, M. Probiotics and irritable Bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.40, n.3, p.264-269, 2006.

CAMPBELL, W.; DRAKE, M.A.; LARICK, D.K. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.1, p.43-51, 2003.

CARIS-VEYRAT, C.; AMIOT, M.; TYSSANDIER, V.; GRASSELLY, D.; BURET, M.; MIKOLAJCZAK, M.; GUILLAND, J.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; BOREL, P. Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant micro constituent content of tomatoes and derived purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.21, p.6503-6509, 2004.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. *Bioquímica ilustrada*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 445p.

CHIANG, B.L.; SHEIH, Y.H.; WANG, L.H.; LIAO, C.K.; GILL, H.S. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.54, p.849-855, 2000.

CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L.; PARIZA, M.W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.5, p.185-197, 1992.

COAKLEY, M.; JOHNSON, M.C.; MCGRATH, E.; RAHMAN, S.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F.; DEVERY, R.; STANTON, C. Intestinal bifidobacteria that produce *trans*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid: a fatty acid with antiproliferative activity against human colon SW480 and HT cancer cells. *Nutrition and Cancer*, v.56, p.95-102, 2006.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. *Dairy starter cultures*. Cambridge: VHC Publishers, 1996. 277p. (Food Science and Technology).

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHÄNEN, E.L. Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. *International Dairy Journal*, v.16, p.1347-1361, 2006.

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.

COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYRMAN, J.; AESSENS, W.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, v.31, n.2, p.126-140, 2008.

CORRIEU, G.; SPINNLER, H.E.; JOMIER, Y.; PICQUE, D. *Method of revealing and monitoring the acidifying activity of fermentation agents in fermentation vats and device for implementing it.* FR Pat. 2,629,612 10 jun. 1989. 27p.

CROISSANT, A.E.; WASHBURN, S.P.; DEAN, L.L.; DRAKE, M.A. Chemical properties and consumer perception of fluid milk from conventional and pasture-based production systems. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.4942–4953, 2007.

CUMMINGS, J.H.; GIBSON, G.R.; MACFARLANE, G.T. Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.86, p.76-82, 1989.

D'AIMMO, M.R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium spp.* isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, v.115, p.35-42, 2006.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCANTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Chemical and viability changes during fermentation and cold storage of fermented milk manufactured using yogurt and probiotic bacteria. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY “FOOD IS LIFE”, 13, Nantes, 2006. *Anais*. Nantes: ADRIA/INRA, 2006. p.1271-1281.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies*, v.39, n.1, p.40-55, 2008.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* *Journal of Dairy Science*, v.79, n.9, p.1529-1536, 1996.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, v.7, n.1, p.31-41, 1997.

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.

DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, v.10, p.37-54, 2005.

DELLAGLIO, F.; ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSEN, D. Caractéristique générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F.M., eds. *Bactéries lactiques*. Loric: Chemin de Saint Georges, 1994. v.1, p.25-116.

DELLAGLIO, F.; TORRANI, S.; VLAEMINCK, G. Specific characteristics of microorganisms used for fermented milks. *Bulletin of the International Dairy Federation*, v.277, p.4-16, 1992.

DEVERY, R.; MILLER, A.; STANTON, C. Conjugated linoleic acid and oxidative behavior in cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, v.29, p.341-344, 2001.

DIAS, R.P. Pró-orgânico programa de desenvolvimento de agricultura orgânica. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agricultura Orgânica. Estatísticas. Situação da Produção Orgânica 2006. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/PRODUTOS_ORGANICOS/AO_DADOS_ESTADISTICAS/SITUA%C7%C3O%20DA%20PRODU%C7%C3O%20ORG%C2NICA%202006.PDF. Acesso em: 10 dez. 2007.

DONG, X.; CHENG, G.; JIAN, W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Systematic and Applied Microbiology*, v.23, p.386-390, 2000.

DONNET-HUGHES, A.; ROCHAT, F.; SERRANT, P.; AESCHLIRMANN, J.M.; SCHIFFRIN, J.E. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by acid lactic bacteria: effective dose. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.863-869, 1999.

DRIESSEN, F.M.; LOONES, A. Developments in the fermentation process: liquid, stirred and set fermented milks. *Bulletin of the International Dairy Federation*, v.277, p.28-40, 1992. [1992 Annual Session of the IDF (International Dairy Federation) on new technologies for fermented milks, Munich, Germany].

DSM FOOD SPECIALTIES. *Bifidobacterium lactis*. LAFTI[®], B94 DSL/DSF, s.d. 2p. [Boletim Técnico].

EBRINGER, L.; FERENČÍK, M.; KRAJČOVIČ, J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products – Review. *Folia Microbiologica*, v. 53, n.5, p.378-394, 2008.

EKINCI, F.Y.; OKUR, O.D.; ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.10, p.216–224, 2008.

ELLIS, K.A.; INNOCENT, G.; GROVE-WHITE, D.; CRIPPS, P.; MCLEAN, G.; HOWARD, C.V.; MIHM, M. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1938–1950, 2006.

FALL, N.; EMANUELSON, U.; MARTINSSON, K.; JONSSON, S. Udder health at a Swedish research farm with both organic and conventional dairy cow management. *Preventive Veterinary Medicine*, v.83, p.186-195, 2008.

FANTI, M.G.N.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M.; SILVA, R.C.; FLORENCE, A.C.R.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, suppl., p.249-255, 2008.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO/WHO, 2002. p 1-11. [Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2008.

FARROW, J.A.E.; COLLINS, M.D. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, v.130, n.2, p.357-362, 1984.

FELSOT, A.S.; ROSEN, J.D. Comment on comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.1, p.146-149, 2004.

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

FERREIRA, C.L.L.F. *Tecnologia de produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos*. Viçosa: UFV, 1995. 96p. (Universidade Federal de Viçosa, n.93).

FOLIGNE, B.; NUTTEN, S.; GRANGETTE, C.; DENNIN, V.; GOUDERCOURT, D.; POIRET, S.; DEWULF, J.; BRASSART, D.; MERCENIER, A.; POT, B. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, v.13, n.2, p.236-243, 2007.

FOOD INGREDIENTS. *Leites fermentados com probióticos contribuem para uma vida mais saudável*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda., mai/jun, n.6, p.40-46, 2000.

FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, Y.; TEREDA, A.; MITSUOKA, T. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food and Microbiology*, v.42, p.39-44, 1998.

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

FULLER, R. Probiotics in human medicine. *Gut*, v.32, p.439-442, 1989.

GAVINO, V.C.; GAVINO, G.; LEBLANC, M.J.; TUCHWEBER, B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *Journal of Nutrition*, v.130, p.27-29, 2000.

GEMMA, S.F.B. Complexidade e agricultura: organização e análise ergonômica do trabalho na agricultura orgânica / Sandra Francisca Bezerra Gemma. Campinas: Unicamp, 2008. 280p.

GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, v.46, p.57-92, (2006).

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

GIBSON G.R.; WANG X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, v.77, p.412-420, 1994.

- GILL, H.S. Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, v.8, p.535-544, 1998.
- GILL, H.S.; DARRAGH, A.J.; CROSS, M.L. Optimizing immunity and gut function in the elderly. *Journal of Nutrition, Health & Aging*, v.5, p.80-91, 2001.
- GILL, H.S.; RUTHERFURD, K.J.; PRASAD, J.; GOPAL, P.K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Brazilian Journal of Nutrition*, v.83, p.167-176, 2000.
- GILLILAND, S.E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v.87, p.175-188, 1990.
- GIRAFFA, G.; NEVIANNI, E. Molecular identification and characterization of food associated lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, v.4, p.403-423, 2000.
- 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 Press; Cambridge: Woodhead, 2003. p.263-298. (Woodhead Publishing in Food Science and Technology).
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition*, v.80, p.S203-S207, 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.; DOMINGUES, J.L. Uso de gordura protegida na dieta de bovinos. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.4, n.5, p.475-486, 2007.
- GOPAL, P.K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H.S. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, v.67, p.207-216, 2001.
- 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 & Therapeutics*, v.23, n.8, p.1077-1086, 2006.
- GOURNIER-CHATEAU, N.; LARPENT, J.P.; CASTELLANOS, M.I.; LARPENT, J.L. *Les probiotiques en alimentation animale et humaine*. Paris: Édition Technologie et documentation Lavoisier, 1994. 192p.
- GRIINARI, J.M.; CORI, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.; BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ -(9)-desaturase. *Journal of Nutrition*, v.130, p.2285-2291, 2000.

- GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.361, n.9356, p.512-519, 2003.
- HA, Y.L.; GRIMM, N.K.; PARIZA, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-treated derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, v.8, p.1881-1887, 1987.
- HALLER, D.; BODE, C.; HAMMES, W.P.; PFEIFER, A.M.; SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell / leukocyte co-cultures. *Gut*, v.47, p.79-87, 2000.
- HAQUE, E.; CHAND, R.; KAPILA, S. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International*, v.25, n.1, p.28-43, 2009.
- HEATON, S. *Organic farming, food quality and human health: a review of the evidence*. Bristol: Soil Association, 2001. 88p.
- HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.374S-379S, 2001.
- HERMANSEN, J.E.; BADSBERG, J.H.; KRISTENSEN, T.; GUNDERSEN, V. Major and trace elements in organically or conventionally produced milk. *Journal of Dairy Research*, v.72, p.362-368, 2005.
- HILLIAM, M. Functional food – how big is the market? *World of Food Ingredients*, v.12, p.50-52, 2000.
- HILLIAM, M. The market for functional foods, *International Dairy Journal*, v.8, p.349-353, 1998.
- HOIER, E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia*, v.44, p.418-420, 1992.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.365S-373S, 2001.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, n.2, p.85-101, 1998.
- HOOPER, L.V.; GORDON, J.I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, v.292, n.5519, p.1115-1118, 2001.
- HOSOYA, N. Health claims in Japan. *Japanese Journal of Nutritional Food*, v.1, n.3/4, p.1-11, 1998.
- HOUSEKNECHT, K.L.; VANDEN HEUVEL, J.P.; MOYA-CAMARENA, S.Y.; PORTOCARRERO, C.P.; PECK, L.W.; NICKEL, K.P.; BELURY, M.A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.244, n.3, p.678-682, 1998.

HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Sciences*, v.78, p.268-276, 1995.

INTERNATIONAL FEDERATION OF ORGANIC MOVEMENTS. About IFOAM. The Organic Principles. *The principles of organic agriculture*. 2006 Disponível em: http://www.ifoam.org/about_ifoam/principles/index.html. Acesso em: 15 jan. 2007.

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, 1985. v.1, 533p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 14156: milk and milk products - extraction methods for lipids and liposoluble compounds*. Geneva: ISO, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 15884: milk fat - preparation of fatty acid methyl esters*. Geneva: ISO, 2002.

IP, C.; BRIGGS, S.P.; HAEGELE, A.D.; THOMPSON, H.J.; STORKSON, J.; SCIMECA, J.A. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, v.17, p.1045–1050, 1996.

ISOULARI, E.; SALMINEN S.; OUWEHAND A.C. Probiotics, best practice & research. *Clinical Gastroenterology* v.18, p. 299-313, 2004.

ITSARANUWAT, P.; KHAWLA, S.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming “health promoting” fermented dairy products; a brief update. *International Journal of Dairy Technology*, v.56, n.4, p.203-210, 2003.

JAHREIS, G.; FRITSCHÉ, J.; MÖCKEL, P.; SCHONE, F.; MÖLLER, U.; STEINHART, H. The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, *cis*-9, *trans*-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research*, v.19, p.1541-1549, 1999.

JAHREIS, G.; FRITSCHÉ, J.; STEINHART, H. Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutrition Research*, v.17, n.9, p.1479-1484, 1997.

JIANG, J.; BJÖRCK, L.; FONDÈN, R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v.85, p.95–102, 1998.

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

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*: their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.52, p.28-35, 1997.

KELLER, R.; KEIST, R.; JOLLER, P.W. Macrophage response to bacteria and bacterial products: modulation of Fcγ receptors and secretory and cellular activities. *Immunology*, v.81, p.161-166, 1994.

- KENNEDY, J.P. Structured lipids: fats of the future. *Food Technology*, v.45, n.11, p.76-83, 1991.
- 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, Y.J.; LIU, R.H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, v.67, p.1731-1738, 2002.
- KIM, Y.J.; LIU, R.H.; RYCHLIK, J.L.; RUSSELL, J.B. The enrichment of a ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* YJ-4 that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, v.92, p.976-982, 2002.
- KLAVER, F.A.M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v.47, p.151-164, 1993.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, p.103-125, 1998.
- KORZENIK, J.; KITTS, C.; PITTLER, A.; ENGLEBREKTSON, A.; SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. A randomized, double-blind, controlled trial of probiotics to minimize the disruption of gut flora as assessed by 16s Rna terminal restriction fragment length polymorphism and culture enumeration in healthy subjects undergoing antibiotic therapy. *Gastroenterology*, v.128, n.4, p.A662-A662, suppl.2, 2005.
- KOTILAINEN, L.; RAJALAHTI, R.; RAGASA, C.; PEHU, E. *Health enhancing foods: opportunities for strengthening the sector in developing countries*. 2006. Washington: World Bank, Agriculture and Rural Development, 2006. p.4-20. (Agriculture and Rural Development. Discussion Paper, 30).
- KOUBA, M. Quality of organic animal products. *Livestock Production Science*, v.80, p.33-40, 2003.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal*, v.13, p.517-528, 2003.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S.K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *Journal of the American College of Nutrition*, v.19, p.472S-477S, 2000.
- KURMANN, J.A.; RASIC, J.L. The health potential of products containing bifidobacteria. In: ROBINSON, R.K., ed. *Therapeutic properties of fermented milks*. London, New York: Elsevier Applied Science, 1991. p.117-158. (Elsevier Applied Food Science Series).
- LAMMERS, K.M.; BRIGIDI, P.; VITALLI, B.; GIONCHETTI, P.; RIZELLO, F.; CARAMELLI, E.; MATTEUZZI, D.; CAMPIERI, M. Immunomodulatory effects of

probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.38, p.165-172, 2003.

LARSSON, S.C.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish mammography cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.82, p.894-900, 2005.

LEE, K.N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M.W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, v.108, p.19-25, 1994.

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

LIM, E. M.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis*, v.21, n.12, p.2557-2561, 2000.

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

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2479-2488, 2004.

MÄKINEN-AAKULA, M. (2006) Trends in functional foods dairy market. In Proceedings of the third functional food net meeting. *Apud* 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.

MANSBRIDGE, R.J.; BLAKE, J.S. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, v.78, s. 1, p. S37-S47, 1997.

MARTIN, A.F. Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas. 2002. 50p. (Mestrado em Ciência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MASCO, L.; VENTURA, M.; ZINK, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1137-1143, 2004.

MATALOUN, M.M.G.B; LEONE, C.R. Peculiaridades do metabolismo de cálcio e fósforo no período perinatal: análise crítica de literatura. *Pediatria*, v.20, n.4, p.332-384, 1998.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, v.11, n.1, p.1-17, 1999.

- MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M., eds. *Functional dairy products*. Boca Raton: CRC Press; Cambridge: Woodhead, 2003. 395p. (Woodhead Publishing in Food Science and Technology).
- MCCRACKEN, V.J.; LORENZ, R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*, v.3, p.1-11, 2001.
- MELE, M.; DAL ZOTTO, R.; CASSANDRO, M.; CONTE, G.; SERRA, A.; BUCCIONI, A.; BITTANTE, G.; SECCHIARI, P. Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n.1, p.392-400, 2009.
- MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, v.56, p. 181-188, 2003.
- METCHNIKOFF, E. The prolongation of life: optimistic studies. London: William Heinemann, 1907. p.161-183.
- MIETTINEN, M.; VUOPIO-VARKILA, J.; VARKILA, K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunity*, v.64, p.5403-5405, 1996.
- MILLER, C.C.; PARK, Y.; PARIZA, M.W.; COOK, M.E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochemical Biophysical Research Communications*, v.198, n.3, p.1107-1112, 1994.
- MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; MCBEAN, L.D. *Handbook of dairy foods and nutrition*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. 423p. (CRC Series in Modern Nutrition).
- MIYAKE, T.; WATANABE, K.; WATANABE, T.; OYAIZU H. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and Immunology*, v.42, p.661-667, 1998.
- MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J.; SCHMIDT, S.; MUELLER, M.; POSSNER, M.; RADKE, M.; BLAUT, M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.11, p.4025-4031, 2006.
- MOLKETIN, J.; GIESEMANN, A. Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.388, p.297-305, 2007.
- MOLKETIN, J. Authentication of Organic Milk Using $\delta^{13}\text{C}$ and the α -Linolenic Acid Content of Milk Fat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2009, doi: 10.1021/jf8022029 [no prelo].
- MORIYA, J.; FACHIN, L.; GÂNDARA, A.L.N.; VIOTTO, W.H. Evaluation of culture media for counts of *Bifidobacterium animalis* in the presence of yoghurt bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.516-520, 2006.

MOURÃO, D.M.; MONTEIRO, J.B.R.; COSTA, N.M.B.; STRIGHETA, P.C.; MINIM, V.P.R.; DIAS, C.M.G.C. Ácido linoléico conjugado e perda de peso. *Revista de Nutrição*, v. 18, n.3, p.391-399, 2005.

NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J.A.; HUTH, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, v.22, p.266-277, 1997.

OH, D.K.; HONG, G.H.; LEE, Y.; MIN, S.G.; SIN, H.S.; CHO, S.K. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.907-912, 2003.

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, p.172-176, 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALARCON, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 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, p.935-942, 2001.

OLIVEIRA, R.P.S.; FLORENCE, A.C.R.; SILVA, R.C.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.128, n.3, p.467-472, 2009a.

OLIVEIRA, R.P.S.; 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. *LWT - Food Science and Technology*, 2009b. [No prelo].

OUWEHAND, A.C.; SALVADORI, B.; FONDEN, R.; MOGENSEN, 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.

OUWEHAND, A.C.; VESTERLUND, S. Health aspects of probiotics. *Drugs*, v.6, p.573-580, 2003.

PALMQUIST, D.L.; JENSEN, R.G. Fatty acids in milk fat. In: CHOW, C.K., eds. *Fatty acids in foods in their health implications*. 3.ed. Boca Raton: CRC Press; London: Taylor & Francis, 2007. p.109-126. (Food Science and Technology).

PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effects of temperature on mutagen formation in pain-fried hamburger. *Cancer Letters*, v.7, p.63-69, 1979.

PARIZA, M.W.; HARGRAVES, W.A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumor by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. *Carcinogenesis*, v.6, p.591-593, 1985.

- PARIZA, M.W.; LORETZ, L.J.; STORKSON, J.M.; HOLLAND, N.C. Mutagens and modulator of mutagens in fried ground beef. *Cancer Research*, v.43, p.2444s-2446s, 1983.
- PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M. Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity. *Toxicological Sciences*, v.52, p.107-110, 1999.
- PARK, Y.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; COOK, M.E.; PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, v.32, p.853-858, 1997.
- PARK, Y.; STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J.; LIU W.; PARIZA, M.W. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*, v.34, p.235-241, 1999.
- PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, London, v. 29, p.4-8, 1974.
- PARODI, P.W. Milk in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 59, p.3-59, 2004.
- PERAN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; BAILON, E.; HENRIKSSON, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.836-844, 2007.
- PICQUE, D.; PERRET, B.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Caractérisation et classification de bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. *LWT – Food Science and Technology*, v.25, n.2, p.181-186, 1992.
- PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; TANSINI, G.; BROGNA, N.; PIVA, G. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, p.472-479, 2007.
- PRASAD, J.; GILL, H.S.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, v.8, n.12, p.993-1002, 1998.
- RADKE-MITCHELL, L.C.; SANDINE, W.E. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.2558-2568, 1986.
- RAINIO, A.; VAHVASELKA, M.; SUOMALAINEN, T.; LAAKSO, S. Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Lait*, v.82, p.91-101, 2002.
- RASTALL, R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *Journal of Nutrition*, v.134, p.2022-2026, 2004.
- RAWSON, H.L.; MARSHALL, V.M. Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v.32, p.213-220, 1997.

- REID, G.; COOK, R.L.; BRUCE, A.W. Examination of strains of lactobacilli for properties which may influence bacterial interference in the urinary tract. *Journal of Urology*, v.138, p.330-335, 1987.
- ROBINSON, R.K, ed. *Dairy microbiology handbook*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. 765p.
- ROSATI, A.; AUMAITRE, A. Organic dairy farming in Europe. *Livestock Production Science*, v.90, p.41-51, 2004.
- ROSS, R.P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science & Technology*, v.11, p.96–104, 2000.
- ROTZ, C.A.; KAMPHUIS, G.H.; KARSTEN, H.D.; WEAVER, R.D. Organic Dairy Production Systems in Pennsylvania: a case study evaluation. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.3961-3979, 2007.
- 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.
- SABOYA, L.V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.31, n.2, jul./dez., 1997.
- SALGADO, J.M.; ALMEIDA, M.A. Mercado de Alimentos Funcionais – Desafios e Tendências, 2008. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTOS FUNCIONAIS. *Artigos Científicos*. Disponível em: http://www.sbaf.org.br/artigos_cientificos.htm. Acesso em: 10 jan. 2009.
- SALMINEN, S.; ISOULARI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *Journal of Pediatrics*, v.149, n.3, p.S115-S120, 2006.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.8, p.563-572, 1998.
- SALMINEN, S.; VON-WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2ed. New York: Marcel Dekker, 1998. 617p. (Food Science and Technology, v.58).
- SÁNCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES A. The F1F0 – ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environmental Microbiology*, v.8, n.10, p.1825-1933, 2006.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.8, p.341-347, 1998.
- SANTOS, M.S.; MEYDANI, S.N.; LEKA, L.; WU, D.; FOTOUHI, N.; MEYDANI, M.; HENNEKENS, C.H.; GAZIANO, J.M. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.64, p.772-777, 1996.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Effects of conjugated linoleic acid on animal metabolism: advances in research and perspectives for the future. *Revista de Nutrição*, v.21, n.2, p.195-221, 2008.

SAZAWAL, S.; DHINGRA, U.; SARKAR, A.; DHINGRA, P.; DEB, S.; MARWAH, D.; MENON, V.P.; KUMAR, J.; BLACK, R.E. Efficacy of milk fortified with a probiotic *Bifidobacterium lactis* (DR-10™) and prebiotic galacto-oligosaccharides in prevention of morbidity and on nutritional status. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.13, p.S28, 2004.

SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.56, p.60-64, 2002.

SCHIFFRIN, E.J.; ROCHAR, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J.M.; DONNET-HUGHS, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v.78, p.491-497, 1995.

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. In: IDF SYMPOSIUM ON SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL CHALLENGES IN FERMENTED MILK / IDF DAIRY SCIENCE AND TECHNOLOGY WEEK, 2., Sirmione, 2006. *Book of abstracts*. Sirmione, 2006. p.35-36.

SHAH, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, v.55, n.11, p.46-53, 2001.

SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFURD, K.J.; FENWICK, S.G.; PRASAD, J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiology and Immunology*, v.44, p.213-222, 2000.

SIEBER, R.; COLLOMB, M.; AESCHLIMANN, A.; JELEN, P.; EYER, H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products: a review. *International Dairy Journal*, v.14, p.1-15, 2004.

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.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTOS FUNCIONAIS. Notícias da Indústria. *Alimentos funcionais crescem 50%*. 2006. Disponível em: http://www.sba.org.br/noticias/200612_Crescimento.htm. Acesso em: 13 dez. 2008.

SPINLER, 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.; GANDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; BRENDAN LYNCH, P.; PAUL ROSS, R. Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.476S-83S, 2001.

TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E. Microbiology and technology of fermented milks. In: LAW, B.A., ed. *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. 2.ed. London: Black Academic & Professional, 1997. p.57-152.

TAMIME, A.Y. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell, 2005. 216p.

TANNOCK, G.W.; MUNRO, K.; BIBILONI, R.; SIMON, M.A.; HARGREAVES, P.; GOPAL, P.; HARMSSEN, H.; WELLING, G. Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.2129-2136, 2004.

TECHNICAL MEMORANDUM (TM 46-Ie) – *Bifidobacterium lactis* Bl-04, Danisco.

TECHNICAL MEMORANDUM (TM 53-Ie) – *Streptococcus thermophilus* TA040, Danisco.

TEGGATZ, J.A.; MORRIS, H.A. Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Structure*, v.9, p.133-138, 1990.

TOBA, T.; NAKAJIMA, H.; TOBITANI, A.; ADACHI, S. Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, p.313-320, 1990.

TOLEDO, P.; ANDRÉN, A.; BJORCK, L. Composition of raw milk from sustainable production systems. *International Dairy Journal*, v.12, p.75-80, 2002.

VALLE, P.S.; LIEN, G.; FLATEN, O.; KOESLING, M.; EBBESVIK, M. Herd health and health management in organic versus conventional dairy herds in Norway. *Livestock Science*, v.112, p.123-132, 2007.

VAN DE GUCHTE, M.; PENAUD, S.; GRIMALDI, C.; BARBE, C.; BRYSON, K.; NICOLAS, P.; ROBERT, C.; OZTAS, S.; MANGENOT, S.; COULOUX, A.; LOUX, V.; DERYN, R.; BOSSY, R.; BOLOTIN, A.; BATTO, J.M.; WALUNAS, T.; GIBRAT, J.F.; BESSIE, P.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S.D.; MAGUIN, E. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.13, n.103, p.24, 2006.

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

VENTURA, M.; VAN SINDEREN, D.; FITZGERALD, G.F.; ZINK, R. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.86, p.205-223, 2004.

VENTURA, M.; ZINK, R. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.12, p.6429-6434, 2002.

VENTUROSOSO, 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.34, p.607-613, 2007.

VICINI, J.; ETHERTON, T.; KRIS-ETHERTON, P.; BALLAM, J.; DENHAM, S.; STAUB, R.; GOLDSTEIN, D.; CADY, R.; MCGRATH, M.; LUCY, M. Survey of retail milk composition as affected by label claims regarding farm-management practices. *Journal of the American Dietetic Association*, v.108, n.7, p.1198-1203, 2008.

VUYST, L.D.; ZAMFIR, M.; MOZZI, F.; ADRIANY, T.; MARSHALL, V.; DEGEEST, B.; VANINGELGEN, F. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, v.13, p.707-717, 2003.

WANG, K.Y.; LI, S.N.; LIU, C.S.; PERNG, D.S.; SU, Y.C.; WU, D.C.; JAN, C.M.; LAI, C.H.; WANG, T.N.; WANG, W.M. Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori* 1-3. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.80, p.737-741, 2004.

WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. *The genera of lactic acid bacteria*. London: Blackie Academic & Professional, 1995. v.2, 397p.

XU, S.; BOYLSTON, T.D.; GLATZ, B.A. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.9064-9072, 2005.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*, v.61, p.47-51, 1998.

ZARATE, S.; LOPEZ-LEIVA, M.H. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *Journal of Food Protection*, v.53, p.262-268, 1990.

ŻEGARSKA, Z.; PASZCZYK, B.; BOREJSZO, Z. Conjugated Linoleic Acid (CLA) and *trans* C18:1 and C18:2 isomers in fat of some commercial dairy products. *Polish Journal of Natural Sciences*, v.23, n.1, p.248-256, 2008.

ZHANG, L.; SU, P.; HENRIKSSON, A.; O'ROURKE, J.; MITCHELL, H. Investigation of the immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* on *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, v.13, p.183-190, 2008.

ZHOU, J.S.; GILL, H.S. Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis. *International Journal of Food Microbiology*, v.103, p.97-104, 2005.

ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.4, p.1-8, 2001.

Tabela de composição em ácidos graxos (%) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), iogurtes orgânicos e convencionais (I) e leites fermentados (LF) por *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12; B94; BL04; HN019) em co-cultura com *S. thermophilus* (St)

AG	Orgânico						Convencional					
	L	I	LF StBB12	LF StB94	LF StBL04	LF StHN019	L	I	LF StBB12	LF StB94	LF StBL04	LF StHN019
4:0	3,22±0,19	3,68±0,50	2,71±0,46	3,56±1,48	3,26±0,86	3,24±0,27	2,72±0,02	3,34±0,09	3,51±0,59	2,77±0,31	2,98±1,02	2,13±0,05
6:0	1,03±0,02	2,49±0,61	2,18±0,09	2,45±0,69	2,54±0,36	1,96±0,27	1,90±0,01	1,92±0,44	2,44±0,33	2,07±0,06	2,44±0,26	1,67±0,31
8:0	1,59±0,37	1,75±0,17	1,40±0,05	2,11±1,10	1,60±0,20	1,37±0,10	1,21±0,01	1,32±0,10	1,52±0,18	1,31±0,04	1,53±0,07	1,47±0,33
10:0	3,21±0,47	3,51±0,39	2,89±0,09	3,75±1,32	3,16±0,34	2,77±0,33	2,54±0,09	2,84±0,16	3,71±0,98	2,82±0,05	3,14±0,25	3,19±0,69
12:0	3,28±0,02	3,94±0,33	3,29±0,16	3,93±1,16	3,41±0,25	2,88±0,25	3,04±0,06	3,25±0,20	3,35±0,37	3,19±0,07	3,36±0,30	3,43±0,49
14:0	11,19±0,01	13,24±0,25	11,70±0,35	12,67±2,77	11,67±0,42	9,64±0,15	10,87±0,17	11,26±0,45	11,16±0,51	10,96±0,42	11,12±0,41	11,49±0,64
14:1	1,18±0,00	1,59±0,03	1,40±0,04	1,64±0,50	1,40±0,05	1,09±0,04	1,17±0,04	1,18±0,05	1,17±0,06	1,16±0,04	1,17±0,04	1,30±0,08
15:0	1,40±0,11	1,80±0,02	1,76±0,09	1,93±0,47	1,69±0,03	0,99±0,31	1,31±0,02	1,30±0,04	1,27±0,02	1,13±0,27	1,27±0,02	1,38±0,07
16:0	28,52±1,15	29,61±0,24	30,23±0,28	29,89±0,71	29,73±0,66	26,78±0,59	30,37±0,02	30,15±0,21	29,79±0,86	29,86±0,36	29,51±0,51	30,53±0,46
16:1	1,73±0,07	1,88±0,03	1,94±0,04	2,06±0,40	1,89±0,03	1,62±0,04	1,80±0,00	1,89±0,27	1,70±0,02	1,77±0,01	1,73±0,04	1,80±0,10
17:0	0,70±0,02	0,83±0,05	0,87±0,01	0,90±0,15	0,85±0,02	0,72±0,01	0,72±0,01	0,67±0,01	0,65±0,02	0,68±0,00	0,67±0,02	0,72±0,04
18:0	12,56±0,30	9,49±0,43	10,67±0,31	10,65±0,44	10,50±0,48	14,37±0,28	12,24±0,04	11,86±0,47	11,56±0,57	12,09±0,19	11,88±0,42	11,62±0,54
18:1	23,39±0,00	18,84±0,74	20,86±0,70	20,87±0,53	20,52±0,93	25,09±0,17	23,39±0,01	22,45±0,63	21,83±0,88	23,26±0,46	22,69±1,07	22,89±1,02
18:1t	3,58±0,58	4,02±0,15	4,40±0,17	3,95±0,25	4,08±0,14	4,06±0,04	3,01±0,06	3,03±0,04	2,92±0,19	3,06±0,11	2,89±0,08	3,12±0,06
18:2	1,84±0,53	1,07±0,32	1,28±0,19	1,21±0,34	1,03±0,24	1,50±0,02	1,93±0,04	2,11±0,07	2,06±0,09	2,17±0,06	2,14±0,11	1,68±0,17
18:3	0,43±0,05	0,64±0,26	0,57±0,04	0,97±0,14	0,85±0,21	0,46±0,05	0,61±0,28	0,38±0,03	0,32±0,05	0,49±0,23	0,37±0,04	0,39±0,03
CLA	1,14±0,00	1,61±0,08	1,86±0,06	1,86±0,29	1,82±0,10	1,47±0,04	1,17±0,02	1,06±0,04	1,05±0,04	1,19±0,15	1,11±0,06	1,18±0,06

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

Tabela de composição em ácidos graxos (%) em leites frescos orgânicos e convencionais (L), e leites fermentados (LF) em cultura pura por *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12; B94; BL04; HN019) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB340)

AG	Orgânico						Convencional					
	L	LF LB340	LF BB12	LF B94	LF BL04	LF HN019	L	LF LB340	LF BB12	LF B94	LF BL04	LF HN019
4:0	2,58±0,50	2,59±0,23	2,92±0,86	3,05±0,35	2,66±0,23	3,13±0,37	3,53±0,60	3,67±0,24	2,99±0,57	3,12±0,36	3,33±0,91	2,96±0,43
6:0	2,03±0,36	1,90±0,16	2,14±0,23	2,35±0,76	1,93±0,15	2,71±0,68	2,68±0,63	3,05±0,45	3,54±0,54	2,19±0,21	2,37±0,60	2,05±0,29
8:0	1,28±0,20	1,20±0,09	1,35±0,14	1,47±0,44	1,23±0,09	1,64±0,25	1,68±0,34	2,01±0,26	2,30±0,27	1,36±0,12	1,46±0,33	1,27±0,18
10:0	2,74±0,40	2,59±0,20	2,91±0,26	3,12±0,85	2,65±0,15	3,26±0,20	3,57±0,65	3,73±0,56	3,60±0,70	3,05±0,25	3,11±0,55	2,85±0,41
12:0	3,10±0,29	3,07±0,24	3,31±0,26	3,47±0,74	3,05±0,13	3,55±0,24	3,76±0,52	3,61±0,72	3,91±0,59	3,42±0,13	3,35±0,33	3,25±0,36
14:0	11,01±0,40	11,16±0,43	11,47±0,39	12,47±0,19	10,96±0,32	12,06±0,26	11,57±0,69	12,35±0,53	12,29±0,19	11,37±0,28	10,99±0,38	10,99±0,71
14:1	1,27±0,05	1,29±0,05	1,33±0,05	1,36±0,18	1,26±0,04	1,36±0,08	1,01±0,06	1,04±0,13	1,19±0,20	1,00±0,03	0,96±0,04	0,96±0,06
15:0	1,36±0,02	1,37±0,02	1,38±0,02	1,39±0,11	1,35±0,02	1,40±0,05	1,23±0,03	1,24±0,06	1,33±0,10	1,23±0,03	1,20±0,02	1,21±0,04
16:0	26,73±0,39	26,74±0,08	26,55±0,14	25,99±0,48	26,54±0,27	26,54±0,29	29,91±0,58	29,89±0,49	29,96±0,61	30,30±0,46	29,84±0,70	30,37±0,16
16:1	1,69±0,05	1,70±0,02	1,67±0,00	1,66±0,04	1,67±0,03	1,67±0,04	1,80±0,54	1,57±0,03	1,55±0,06	1,61±0,03	1,57±0,03	1,60±0,02
17:0	0,68±0,03	0,68±0,01	0,66±0,02	0,64±0,03	0,66±0,03	0,65±0,02	0,61±0,05	0,59±0,04	0,56±0,06	0,62±0,01	0,62±0,03	0,63±0,02
18:0	12,97±0,59	12,92±0,38	12,45±0,48	12,35±0,76	13,06±0,28	11,92±0,27	11,90±0,88	11,04±0,75	11,09±0,14	12,46±0,35	12,54±0,72	12,82±0,79
18:1	25,01±1,22	25,02±0,79	24,22±0,73	23,35±2,02	25,08±0,47	22,96±0,48	20,98±1,10	20,47±0,73	20,60±0,62	22,13±0,56	22,39±1,19	22,69±1,26
18:1t	3,84±0,16	4,04±0,10	3,94±0,16	3,81±0,34	4,11±0,14	3,75±0,10	2,13±0,13	2,19±0,28	1,97±0,32	2,29±0,05	2,41±0,24	2,39±0,22
18:2	1,61±0,09	1,63±0,04	1,60±0,07	1,50±0,13	1,65±0,06	1,48±0,06	2,56±0,26	2,49±0,34	2,22±0,39	2,73±0,13	2,69±0,14	2,82±0,16
18:3	0,49±0,03	0,48±0,02	0,46±0,01	0,45±0,04	0,49±0,02	0,44±0,02	0,38±0,07	0,38±0,08	0,31±0,04	0,39±0,04	0,41±0,07	0,40±0,06
CLA	1,61±0,04	1,64±0,04	1,66±0,00	1,60±0,07	1,65±0,04	1,49±0,05	0,70±0,07	0,68±0,12	0,62±0,07	0,74±0,02	0,76±0,04	0,75±0,10

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