

## Desenvolvimento de Pó Efervescente Probiótico e Simbiótico

### Development of Effervescent Probiotic and Symbiotic Powder

Silvia Batista Muller<sup>a\*</sup>; Raúl Jorge Hernan Castro Gómez<sup>a</sup>; Caroline Maria Calliari<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, PR, Brasil

\*E-mail: silvia-farma@hotmail.com

Recebido: 22 de novembro de 2012; Aceito: 8 de março de 2013.

#### Resumo

*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* são micro-organismos probióticos eficazes na diminuição de risco de doenças coronarianas, redução do transpasse de enterobactérias fecais e redução dos sintomas da síndrome do intestino irritado, porém o comportamento desses micro-organismos em determinadas condições ainda necessita ser elucidado. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um pó efervescente probiótico e simbiótico contendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* e testar o efeito da adição de inulina na formulação em função da viabilidade dos micro-organismos no produto nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias de armazenamento e após digestão *in vitro*. Os caldos lactose, MRS e sacarose foram avaliados para a obtenção do *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* em pó nas temperaturas de desidratação em estufa: 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, e a combinação caldo/temperatura de desidratação de maior viabilidade dos micro-organismos foi sacarose/40 °C. Foram testadas duas formulações: (F1) base efervescente, saborizante de laranja e lactose contendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*; (F2) formulação F1 adicionada de 1g de inulina. Na avaliação da estabilidade ao armazenamento até 45 dias, os micro-organismos se apresentaram viáveis em F1 (pH 5,65, umidade 1,8% e atividade de água 0,467) e F2 (pH 5,81, umidade 2,8% e atividade de água 0,402), acima do requerido para ter efeito probiótico (10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC). No teste de digestão *in vitro*, em contato com fluido gástrico simulado (FGS), a viabilidade do *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* decresceu, havendo recuperação parcial em contato com fluido intestinal simulado (FIS). Para as duas formulações, em ambos fluidos, a contagem dos *Lactobacillus* esteve no nível preconizado para apresentar efeito probiótico. A presença de inulina na formulação apresentou efeito significativo na manutenção da viabilidade celular.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus rhamnosus*. Inulina. Digestão.

#### Abstract

*Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* are probiotic microorganisms efficient in reducing risk of coronary heart disease, reducing the overlapping of fecal enterobacteria, and reducing the symptoms of irritable bowel syndrome, but the behavior of the microorganism under certain conditions need to be elucidated. The objective of this study was to develop an effervescent probiotic and symbiotic powder containing *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* and study the effect of inulin addition by evaluating of microorganisms viability in the product at 0, 15, 30 and 45 days and after digestion *in vitro*. The broths lactose, MRS and sucrose were evaluated for obtaining *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* powder at dehydration temperatures of 40 °C, 45 °C, 50 °C, and 55 °C. The combination broth/dehydration temperature that resulted in higher viability of the microorganisms was sucrose/40 °C. Two formulations were tested: (F1) effervescent base, orange flavor and lactose containing *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*; (F2) formulation F1 with 1g of inulin. Regarding the storage stability of the microorganisms, they were viable in F1 (pH 5.65, moisture 1.8% and water activity 0.467) and F2 (pH 5.81, moisture 2.8% and water activity 0.402), above the levels required to have probiotic effect (10<sup>8</sup> to 10<sup>9</sup> UFC). In *in vitro* digestion, the viability of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* decreased in contact with simulated gastric fluid (SGF), with partial recovery in simulated intestinal fluid (SIF). For both formulations, at both simulated fluids the enumeration of *Lactobacillus* was within the limits recommended for presenting probiotic effects. The inulin significantly affected the cell viability.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus rhamnosus*. Inulin. Digestion.

#### 1 Introdução

Em formulações farmacêuticas, a efervescência apresenta efeito positivo na palatabilidade dos produtos, atua como estabilizante da mucosa gástrica, pode incrementar a absorção medicamentosa e melhorar a solubilização dos pós contidos na fórmula devido a turbulência causada pela efervescência. A efervescência é promovida pela reação de um carbonato ou bicarbonato com um ácido orgânico, como o cítrico ou o tartárico, promovendo a liberação de gás (oxigênio ou anidrido carbônico) na presença de água<sup>1</sup>.

Probióticos são micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo<sup>2</sup>. O probiótico *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria láctica aeróbia facultativa, que apresenta, como diferencial, a produção acelerada de lactato<sup>3</sup> e aumento do nível de hemoglobina em humanos<sup>4</sup>. Assim como o *L. plantarum*, o *L. rhamnosus* apresenta segurança e eficácia como probiótico, podendo auxiliar na diminuição de risco de doenças coronarianas, redução do transpasse de enterobactérias fecais, e minimização dos sintomas da síndrome do intestino irritado<sup>5</sup>. *L. plantarum* e

*L. rhamnosus* são utilizados em conjunto para melhorar sabor em queijos e salames e, por competição e produção de bacteriocinas, inibem a multiplicação de *Pseudomonas*, leveduras, bolores, clostrídios e *Lactobacillus* heterofermentativos<sup>4</sup>.

Uma das aplicações dos probióticos se dá no tratamento de infecções gastrointestinais, em substituição à terapia tradicional com antibióticos<sup>6</sup>, como uma alternativa natural, mais eficaz e sem efeitos secundários<sup>7</sup>.

Conforme a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar entre  $10^8$  a  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) na recomendação de ingestão diária do produto pronto para o consumo. Valores menores podem ser aceitos, desde que o fabricante comprove sua eficácia<sup>8</sup>.

Segundo Gibson e Roberfroid<sup>6</sup>, prebióticos são carboidratos não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade das bactérias benéficas do cólon e, conseqüentemente, melhorando a saúde. Efeitos e aspectos inerentes aos prebióticos são o baixo valor calórico (<2,15kcal), aumento do volume de fezes, e modulação da microbiota intestinal por estimulação das bactérias benéficas. A incorporação de prebióticos na dieta intensifica a viabilidade e adesão de bactérias benéficas (entre elas, os *Lactobacillus*) no trato gastrointestinal, alterando a composição da microbiota<sup>9</sup>.

A inulina é um prebiótico extraído de diversos vegetais e encontrado em maior quantidade na chicória<sup>10,11</sup>. Apresenta solubilidade maior que a da sacarose, não cristaliza, não precipita<sup>12</sup> e pode modificar a composição microbiana, estimulando o crescimento ou ativando o metabolismo das bactérias benéficas do cólon, tendo como consequência efeitos benéficos para o hospedeiro<sup>7</sup>. Probióticos e prebióticos, quando presentes no mesmo produto, dão origem a um efeito simbiótico, afetando benéficamente o hospedeiro, e melhorando a sobrevivência e implantação dos micro-organismos na parede do intestino<sup>13</sup>.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um pó efervescente probiótico e simbiótico contendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* e avaliar o efeito da inulina na viabilidade dos micro-organismos no produto até 45 dias de armazenamento e a viabilidade após a digestão *in vitro*.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Produção de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* em pó

*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* (LPRA) liofilizado SACCO® foi dissolvido em água estéril (1:10) e as bactérias foram ativadas em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) a 37 °C por 24h. Para a definição da composição do cultivo e da temperatura de desidratação, uma alíquota de caldo (1%) foi inoculada em três caldos distintos: 1) água peptonada contendo 2% de sacarose, 2) água peptonada contendo 2% de lactose e 3) caldo MRS 5,5% (preparado conforme as instruções

do fabricante), que foram incubados a 37 °C por 24h. Uma alíquota (10g) de cada caldo foi adicionada de lactose (1:1) e a mistura disposta em pratos plásticos brancos, devidamente higienizados e desinfetados, e levados para a desidratação da mistura em estufa bacteriológica a 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C durante 6 horas. As amostras foram pulverizadas em gral e acondicionadas em recipientes esterilizados. Para definir o caldo e a temperatura resultantes em melhor crescimento bacteriano, foi realizado o teste de viabilidade dos micro-organismos por dissolução de 1g de cada amostra em 9 mL de água peptonada estéril, diluindo sucessivamente até  $10^{-11}$  e inoculando em Agar MRS pela técnica *pour plate*, com incubação a 37 °C por 48h.

A partir dos resultados deste experimento foram selecionadas as condições (caldo e temperatura) com maior crescimento.

### 2.2 Formulação efervescente probiótica e simbiótica

Foram elaboradas duas formulações: (F1) 5g de base efervescente (46% de bicarbonato de sódio, 44% de ácido cítrico, 10% de carbonato de sódio), 4g de saborizante para picolé Selecta® Tropical sabor laranja (composição: amido de milho, fécula de mandioca, acidulantes: ácido cítrico e fumárico, aromatizante idêntico ao natural, antiemectante: fosfato tricálcico, corantes artificiais: amarelo crepúsculo e amarelo tarzanita) e 1g de lactose contendo LPRA; e (F2) 4g de base efervescente, 4g de saborizante para picolé Selecta® Tropical sabor laranja, 1g de lactose contendo LPRA e 1g de inulina BENEIO-Orafti® HP. As formulações foram acondicionadas em envelopes de plástico laminado (10 g cada) e armazenadas a temperatura ambiente.

Aos 45 dias de armazenamento, a umidade das amostras foi determinada por desidratação em estufa a 105 °C<sup>14</sup> e a atividade de água medida em equipamento AQUA LAB CX-2®. Para a determinação do pH, cada formulação foi dissolvida em água deionizada (previamente fervida) 1:10 (p/v) a 25 °C e após cessar a efervescência, o pH foi medido com potenciômetro Tecnal Tec-3MP<sup>14</sup>.

### 2.3 Efeito do trato gastrointestinal na viabilidade de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*

As formulações F1 e F2 foram testadas quanto à sobrevivência microbiana, simulando as condições do trato gastrointestinal *in vitro*. Adicionou-se 10 g de produto (conteúdo do envelope) em 90 mL de fluido gástrico simulado (FGS) esterilizado pH 2,0 (HCl 0,08 M contendo 0,2 % de NaCl), permanecendo em contato por duas horas em estufa a 37 °C. Após 30, 60, 90 e 120 minutos 1,0 mL de amostra foi coletado para a determinação da viabilidade dos micro-organismos. Após 120 minutos, 1,0 mL foi adicionado a 9,0 mL de fluido intestinal simulado (FIS) estéril pH 6,8 (K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M adicionado de 0,6 % de sais biliares) incubado em estufa a 37 °C por 150 minutos, e 1,0 mL coletado para verificar a viabilidade dos probióticos<sup>16</sup> por inoculação em Agar MRS pela técnica *pour plate* e incubação a 37 °C por 48h<sup>15</sup>.

## 2.4 Viabilidade bacteriana no pó efervescente

A viabilidade do LPRA foi avaliada imediatamente após a formulação (tempo zero) e após 15, 30 e 45 dias de armazenamento das formulações em envelopes de plástico laminado, mantidos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Também foi avaliada a viabilidade do LPRA após simulação de digestão. A viabilidade do micro-organismo foi avaliada por dissolução de 1g de amostra em 9 mL de água peptonada estéril, diluindo sucessivamente até  $10^{-11}$  e inoculando em Agar MRS pela técnica *pour plate*, com incubação a 37 °C por 48h<sup>16</sup>.

## 2.5 Análise estatística

A viabilidade dos micro-organismos foi avaliada pela análise de variância ANOVA para detectar diferenças significativas, e as médias, obtidas a partir de contagem em triplicata, comparadas pelo teste de Tukey com nível de 5 % de significância, utilizando o programa Statistica 7.1.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Produção de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* em pó

Quando cultivado em presença de sacarose, com posterior desidratação do caldo a 40 °C, LPRA apresentou contagem significativamente superior em comparação aos outros substratos frente à desidratação a 40°-55 °C (Tabela 1).

**Tabela 1:** Efeito da composição e da temperatura de desidratação do caldo de cultivo na viabilidade de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* (Log UFC.g<sup>-1</sup>).

Caldo (p/v)	Temperatura (°C)			
	40	45	50	55
Lactose 2%	8,17±0,11 <sup>a</sup>	8,30±0,10 <sup>a</sup>	8,00±0,19 <sup>a</sup>	8,00±0,15 <sup>a</sup>
MRS	8,90±0,07 <sup>b</sup>	8,84±0,12 <sup>b</sup>	8,30±0,20 <sup>a</sup>	8,30±0,10 <sup>a</sup>
Sacarose 2%	11,30±0,21 <sup>c</sup>	8,71±0,20 <sup>b</sup>	8,55±0,17 <sup>b</sup>	8,11±0,17 <sup>a</sup>

Valores são médias ± desvio padrão dos resultados, em triplicatas. Médias acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

A interação entre o substrato utilizado e a temperatura de desidratação apresentou efeito significativo sobre o crescimento microbiano, com a vantagem econômica do uso da estufa em comparação a outros métodos de desidratação<sup>17</sup> e da contagem significativamente superior de LPRA na temperatura mais baixa entre as testadas. Um fator importante para a elevada contagem de LPRA foi a desidratação do caldo quando os probióticos se encontravam na fase estacionária, o que aumenta a resistência dos micro-organismos ao estresse causado pela desidratação e operações subsequentes<sup>18,19</sup>.

Em estudos de crescimento de *L. plantarum* frente a diferentes substratos, a sacarose foi o mais consumido em comparação a rafinose e estaquiase, resultando em contagem bacteriana superior<sup>20</sup>. Linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* cultivados em leite reconstituído adicionado de inulina e subsequente atomização apresentaram viabilidade de  $10^9$

UFC.g<sup>-1</sup>, considerada elevada<sup>19</sup>.

Diante dos resultados obtidos, o caldo contendo 2% de sacarose foi selecionado para o cultivo do LPRA, com desidratação subsequente a 40 °C, e o pó resultante foi utilizado nas formulações efervescentes.

### 3.2 Viabilidade do *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* no pó efervescente

Os pós efervescentes são preparações extemporâneas, ou seja, devem ser reconstituídos em água para serem administrados. É necessário que o fármaco esteja totalmente solubilizado após efervescência, para que seja absorvido no trato gastrointestinal<sup>1</sup>. As formulações de pó efervescente F1 e F2 contendo LPRA apresentaram aspecto físico semelhante: pó granular de cor alaranjada com cristais de cor branca. Após a reconstituição em água potável (1:20, p/v), as formulações efervescentes apresentaram completa dissolução, resultando em soluções de cor alaranjada com aroma de laranja.

Referente às características físico-químicas das formulações, estas se apresentaram de acordo com o padrão estabelecido para bases efervescentes<sup>1</sup>: (F1) 1,8% umidade, 0,467 de atividade de água e pH 5,65 e (F2) 2,8% de umidade, 0,402 de atividade de água e pH 5,81. O teor de umidade mais elevado para F2 se deve à característica altamente higroscópica da inulina adicionada à formulação, o que também explica a atividade de água mais baixa (menos água disponível). A baixa atividade de água das formulações indica a segurança microbiológica, pois impede a contaminação posterior do produto<sup>21</sup>.

Quanto à sobrevivência dos micro-organismos ao armazenamento da formulação efervescente em envelopes de plástico laminado à temperatura ambiente, para a formulação F1, a viabilidade se manteve inalterada ao longo de 45 dias de armazenamento, enquanto em F2 a viabilidade de LPRA foi significativamente superior (dois ciclos logarítmicos) a F1 nos períodos analisados, com queda de um ciclo logarítmico na viabilidade somente aos 45 dias. Em ambas as formulações, até 45 dias de armazenamento, a contagem de LPRA se apresentou superior ao requerido para assegurar o efeito probiótico (Tabela 2)<sup>8</sup>.

**Tabela 2:** Viabilidade do *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) no pó efervescente até 45 dias de armazenamento.

Formulação	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
F1	11,30±0,09 <sup>a</sup>	11,47±0,08 <sup>a</sup>	11,47±0,10 <sup>a</sup>	11,30±0,19 <sup>a</sup>
F2	13,60±0,04 <sup>b</sup>	13,60±0,05 <sup>b</sup>	13,60±0,12 <sup>b</sup>	12,23±0,10 <sup>c</sup>

F1: pó efervescente contendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*.

F2: pó efervescente contendo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e inulina.

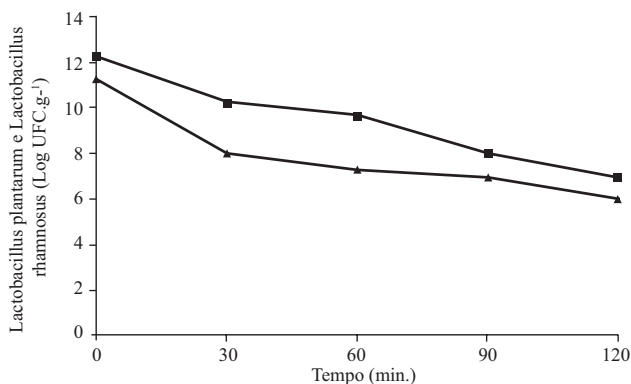
Valores são médias ± desvio padrão dos resultados, em triplicatas. Médias acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Observou-se uma manutenção superior da viabilidade do LPRAs para a formulação F2, o que é explicado pelo efeito prebiótico da inulina, que pode contribuir na sobrevivência dos micro-organismos no produto em pó, mesmo após a desidratação<sup>19</sup>. Além disso, devido à alta higroscopicidade da inulina, esta supostamente protegeu as membranas celulares da desidratação, bem como de outros intercâmbios com o meio.

Estudos de viabilidade durante 60 dias de armazenamento de *L. rhamnosus* atomizado após cultivo em leite reconstituído contendo inulina resultaram em contagens inferiores às obtidas neste trabalho e sem efeito significativo da inulina na manutenção da viabilidade celular<sup>19</sup>.

### 3.3 Efeito do trato gastrointestinal na viabilidade de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*

Na Figura 1 pode-se observar o efeito do fluido gástrico simulado (FGS) sobre os micro-organismos nas formulações F1 e F2, com diminuição estatisticamente significativa da viabilidade em função do tempo de exposição dos produtos ao pH 2,0. Estes resultados concordam com estudos, nos quais linhagens de *Lactobacillus* apresentaram decréscimo na viabilidade em valores de pH abaixo de 2,5<sup>22</sup>. A contagem bacteriana superior no caso de F2 se dá pela acidez mais baixa da formulação, pela presença da inulina (pH 5,81) em comparação a F1 (pH 5,65)<sup>23</sup>, além do efeito prebiótico da inulina, com efeito protetor ao LPRAs.



**Figura 1:** Efeito do Fluido Gástrico Simulado (FGS) sobre a viabilidade de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) após 30, 60, 90 e 120 minutos.

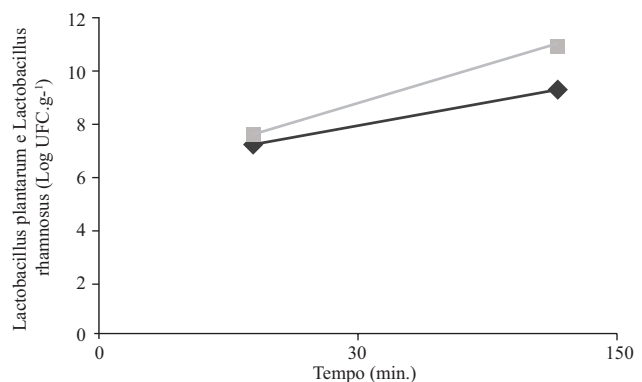
▲ (F1) Base efervescente, saborizante de laranja e lactose contendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*; ■ (F2) formulação F1 adicionada de 1g de inulina.

Normalmente os alimentos sólidos permanecem no estômago entre 2 e 4 horas e os líquidos apenas 20 minutos<sup>24,25</sup>. Considerando que a o número de células viáveis após 20 minutos de contato com o fluido gástrico simulado foi de 9,00 (Log UFC.g<sup>-1</sup>) para F1 e 11,30 (Log UFC.g<sup>-1</sup>) para F2 e que o pó efervescente contendo LPRAs seria dissolvido em água para ser ingerido, a forma de administração deste produto pode ser

considerada uma vantagem para a sobrevivência dos micro-organismos no ambiente gástrico.

Ainda que LPRAs tenha apresentado diminuição de cinco ciclos logarítmicos tanto em F1 quanto em F2, os *Lactobacillus* apresentaram a contagem preconizada para efeito probiótico no intestino (10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>) até o final da exposição ao FGS (150 minutos), nas duas formulações<sup>26</sup>.

Quanto à viabilidade do LPRAs, após transferir as formulações da condição gástrica simulada, observou-se reativação das bactérias (Figura 2) no fluido intestinal simulado (pH 6,8), com aumento na viabilidade microbiana em função do tempo. Vale ressaltar o efeito da inulina na viabilidade dos micro-organismos após 150 minutos.



**Figura 2:** Efeito do Fluido Intestinal Simulado (FIS) sobre a viabilidade de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) após 30 e 150 minutos. ▲ (F1) Base efervescente, saborizante de laranja e lactose contendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* ■ (F2) Formulação F1 adicionada de 1g de inulina.

O mecanismo de tolerância microbiana aos sais biliares não está completamente elucidado e é difícil definir a concentração limite para um micro-organismo ser considerado resistente à bile<sup>27,28</sup>. Observa-se na Figura 2, que apresenta a recuperação da viabilidade celular em função do tempo, que os micro-organismos são mantidos em pH 6,8, favorável para *L. plantarum*<sup>29</sup> e *L. rhamnosus*<sup>19</sup> e em contato com os sais biliares a 0,6%. Em estudo com *Lactobacillus plantarum* isolados de leite e queijo de ovelha, submetidos a condições gastrointestinais *in vitro*, os micro-organismos apresentaram potencial recuperação na concentração de 0,15 a 0,3% de sais biliares<sup>30</sup>.

Com relação ao efeito positivo da inulina sobre a viabilidade celular de LPRAs, de acordo com pesquisas, há uma vantagem competitiva para o probiótico, se consumido juntamente com o prebiótico. O consumo de probióticos e prebióticos na mesma formulação pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microorganismo ideais<sup>31</sup>.

#### 4 Conclusão

As formulações efervescentes testadas neste estudo são consideradas veículos apropriados para a administração dos probióticos *Lactobacillus plantarum* e *L. rhamnosus*, que se apresentaram tolerantes a desidratação, ao armazenamento e exposição às condições gastrointestinais simuladas. A adição de inulina incrementou substancialmente a sobrevivência dos probióticos no estudo.

#### Referências

- Prista LVN. Tecnologia farmacêutica I. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2008.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Rdc N° 2, de 7 de Janeiro de 2002 Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.
- Mcfall SM, Montville PE. pH Mediated regulation of piruvate catabolism in *Lactobacillus plantarum* Chemostat Cultures. J Ind Microbiol 1989;4:335-40.
- Santos DX. Avaliação de indivíduos com síndrome metabólica, antes e após ingestão de leite fermentado com *Lactobacillus plantarum*-LP 115. Londrina: UEL; 2012.
- Vries MC, Vaughanb EE, Kleerebezema M, Vos WM. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. Intern Dairy J 2006;16:1018-28.
- Gibson GR, Roberfroid M. Dietary Modulation of Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotic. J Nutr 1995;125:1401-12.
- Gibson GR, Probert HM, van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutr Res Rev 2004;17:259-75.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2009.
- Reid G. The scientific basis for Probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl Environ Microbiol 1999;65(9):3763-6.
- Boeckner, LS, Schnepf, MI, Tunglund, BC. Inulin: a review of nutritional and health implications. Adv Food Nutr Res 2000;43:1-63.
- Deis RC. Adding bulk without adding sucrose. Cereal Food World 1994;39(2):93-7.
- Bornet FR. Undigestible sugars in food products. Am J Clin Nutr 1994;59(3):763-9.
- Andersson H, Asp N-G, Bruce A, Roos S, Wadstrom T, Wold AE. Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies. Scand J Nutr 2001;45:58-75.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis II. Arlington: Association of Official Analytical Chemists; 1995.
- Thantsha MS, Cloete TE, Moolman FS, Labuschagne PW. Supercritical carbon dioxide interpolmer complexes improve survival of *B. longum* Bb-46 in simulated gastrointestinal fluids. Int J Food Microb 2008;129:88-92.
- Santos Junior JR, Batista RA, Rodrigues SA, Xavier Filho L, Lima AS. Antimicrobial activity of broth fermented with kombucha colonies. J Microb Bioch Technol 2009;1:72-8.
- Betoret N, Puente L, Díaz MJ, Pagán MJ, García MJ, Gras ML, et al. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. J Food Eng 2003;56(2/3):273-7.
- Agudelo C, Ortega R, Hoyos JL. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. Rev Bio Agro 2010;8(2):8-16.
- Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. J Appl Microbiol 2004;96:1024-39.
- Ounis WB, Champagne CP, Makhlof J, Bazinet L. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. Desalination 2008;229:192-203.
- Martins FS, Rosa CA, Nicoli JR, Machado DCC, Penna FJ, Neves MJ. Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos a base de leveduras. Rev Bras Med 2006; 63:36-41.
- Hwanhlem N, Watthanasakphuban N, Riebroy S, Benjakul S, H-Kittikun A, Maneerat S. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. Intern J Food Sci Technol 2010;45:594-601.
- Zarate G, Perez-Chaia A, Gonzalez S, Oliver G. Viability and B-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. J Food Protect 2000;63:1214-21.
- Huang Y, Adams MC. *In vitro* Assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. Int J Food Microbiol 2004;91:253-60.
- Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res Intern 2003;36:895-904.
- Nicoli JR, Vieira LQ. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: Castro LP, Coelho LGV. Gastroenterologia. Rio de Janeiro: MEDSI; 2004. p.1037-47.
- Madureira AR, Pereira CI, Truszkowaka K, Gomes AM, Pintado ME, Malcata AM. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. Intern Dairy J 2005;15:921-7.
- Martins FS, Barbosa FHF, Penna FJ, Rosa CA, Nardi RMD, Neves MJ, et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. Rev Bio Ciênc Terra 2005;5(2).
- Villavicencio ARN, Sant' Anna ES, Tôrres RCO. Produção de *lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. Braz Arch Biol Technol 1999;42(2):1-6.
- Meira SM, Helfer VE, Velho RV, Medina LFC, Brandelli A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. Braz J Food Technol 2010;3:75-80.
- Puupponen-Pimiä R, Aura A-M, Oksman-Caldentey K-M, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm P, et al. Development of functional ingredients for gut health. Trends Food Sci Technol 2002;13:3-11.

