

SOBREVIVÊNCIA DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* EM QUEIJO DE CABRA APÓS CONDIÇÕES SIMULADAS DO SISTEMA GASTRINTESTINAL HUMANO

Survival of *Bifidobacterium animalis* in goat cheese after simulated gastrointestinal tract conditions

Alcina Maria Liserre¹
Patrícia Blumer Zacarchenco¹
Gustavo de Miranda Chaves¹
Karina Maria Olbrich dos Santos²
Marco Aurélio Delmondes Bomfim²
Luís Eduardo Laguna²
Izildinha Moreño¹

RESUMO

A inclusão de óleo de soja na dieta de cabras resulta em leite com maior proporção de ácidos graxos insaturados e teor elevado de ácido linoléico conjugado (CLA). Neste estudo, preparou-se queijo com leite de cabras submetidas a esta dieta especial para a obtenção de elevado teor de CLA e também com o leite de cabra controle. Os queijos foram adicionados de *Bifidobacterium animalis* durante seu processamento. Após 30 dias de estocagem refrigerada, amostras deste queijo e do queijo controle foram avaliadas para quantificação de *B. animalis* e sobrevivência dos probióticos à passagem simulada pelo sistema gastrointestinal. O suco gástrico com pH 2,5 foi adicionado de pepsina (3g/L). O suco entérico, com a adição de bile (3g/L), foi simulado com pH 5,6 e 7,5, de acordo com as condições do sistema intestinal humano. As contagens totais de *Bifidobacterium animalis* para os dois tipos de queijos foram semelhantes, 7,65 e 7,47 logUFC/g, respectivamente, para queijo com CLA e para o queijo controle. Considerando para consumo porção diária de 30g de queijo, obtém-se um total de 10⁸ células, o que atende às exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais. Após o ensaio em condições simuladas do sistema gastrointestinal, as populações de bifidobactérias foram reduzidas a 4,28 e 6,20 logUFC/g para os queijos com CLA e controle, respectivamente. Conclui-se que as contagens do probiótico após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile foram menores nas amostras de queijos feitos a partir de leite com alto teor de CLA.

Termos para indexação: probiótico, leite de cabra, ácido linoléico conjugado, CLA.

1 INTRODUÇÃO

A importância da caprinocultura leiteira no Brasil é crescente, particularmente nas regiões semi-áridas (CORDEIRO, 2006). Estimular a demanda de leite caprino e derivados, gerando agregação de valor a esses produtos são ações com impacto positivo direto sobre a cadeia produtiva.

Aspectos nutricionais e de saúde podem representar um diferencial importante para os produtos lácteos caprinos no mercado. As proteínas do leite de cabra apresentam maior digestibilidade e menor potencial alergênico que as de vaca, e a gordura é mais digerível (HAENLEIN 2004).

1 Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Av. Brasil, 2880, Cx. Postal 139, CEP 13070-178, Campinas, SP., Fone: 55-19-37431869, Fax: 55-19-37431862. E-mail: alcina.maria@ital.sp.gov.br.

2 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. Estrada Sobral-Groaíras Km 04 Zona rural CEP: 62011-970 – Sobral, CE – Brasil.

O perfil lipídico do leite caprino pode ser melhorado através da suplementação da dieta dos animais com óleos vegetais, como constatado em pesquisa da Embrapa Caprinos, na qual a inclusão de óleo de soja na dieta resultou em leite com maior proporção de ácidos graxos insaturados e teor elevado de ácido linoléico conjugado (CLA) (BOMFIM et al. 2006). O CLA constitui-se de um grupo de isômeros do ácido linoléico com propriedades anticarcinogênica, antiaterogênica, antioxidante e imunomoduladora evidenciadas em estudos com animais.

A incorporação de atributos de saúde adicionais aos alimentos é uma oportunidade de negócio, devido à expansão do mercado de alimentos funcionais e ao alto valor agregado desses produtos. No segmento de funcionais, a adição de probióticos é importante inovação no desenvolvimento de novos produtos (KONGO et al. 2006). Diversos efeitos benéficos para a saúde humana têm sido atribuídos à ingestão regular de alimentos com probióticos como a prevenção de desordens e de infecções gastrointestinais e a ação imunomoduladora, já cientificamente fundamentados (FAO/WHO 2006).

Leites fermentados com *Bifidobacterium* são os produtos probióticos mais estudados, comercialmente disponíveis e que impulsionam o mercado de funcionais no Brasil. A introdução de bifidobactérias probióticas em queijos os coloca como veículos promissores desses microrganismos. Comparando aos leites fermentados, os queijos apresentam características físico-químicas que favorecem a manutenção da viabilidade dos probióticos: pH mais alto, menor conteúdo de oxigênio e maior estabilidade do meio na estocagem (BOYLSTON et al. 2004). As bifidobactérias são anaeróbios estritos e sensíveis a pH ácido (GOMES e MALCATA, 1999) e devem manter-se viáveis durante o processamento, maturação e estocagem do queijo. Além disso, devido ao maior teor de gordura, os queijos podem ter efeito protetor na passagem pelo trato gastrointestinal (BURITI et al. 2005).

O desenvolvimento de produtos lácteos probióticos envolve questões de natureza tecnológica e relativas à saúde humana. Para que o produto apresente o potencial de exercer efeito probiótico, é importante que mantenha alta concentração de células viáveis do probiótico no momento do consumo. Considera-se que o produto deve conter pelo menos 10^6 - 10^7 UFC/g ou mL para um efeito probiótico efetivo (VINDEROLA, REINHEIMER 2000; KALAVOUZRIOTI et al. 2005). A legislação brasileira reconhece vários probióticos e, entre eles, o *B. animalis* (BRASIL 2008). É autorizada a inserção de alegações de efeito sobre a saúde na rotulagem de produtos que apresentam concentrações superiores a 10^6 células por porção diária de consumo até o final de seu prazo de validade. Desenvolver um queijo probiótico depende, portanto, da garantia da viabilidade dos probióticos no processamento, maturação e estocagem. Além disso, a cultura não deve afetar negativamente as características do produto, em especial a sensorial, que influencia a inserção do produto no mercado (STANTON et al. 2001). Por isto, é importante monitorar a contagem das bactérias e demais características do produto. Estudo de Gomes e Malcata (1998) constatou que as bifidobactérias podem ser adicionadas com sucesso em queijo de cabra fresco.

Deve-se considerar também que efeito dos probióticos está diretamente relacionado com a sua atividade no trato digestivo, e esta depende de sua sobrevivência nesse ambiente, por isso essas bactérias devem ser resistentes aos processos fisiológicos e físico-químicos do trato gastrointestinal (GI). Os parâmetros fisiológicos compreendem pH, concentração de enzimas gástricas e do intestino delgado, bile, e a cinética da passagem do quimo através do estômago e do intestino. Embora essas bactérias tenham sido isoladas de vários pontos do trato GI humano, o íleo e o cólon parecem ser os locais preferenciais de sua colonização no intestino. Assim, além de estar presente no produto em concentração significativa, para ação benéfica efetiva no intestino os probióticos devem ser capazes de sobreviver à alta acidez do estômago e à presença de bile, para colonizá-lo e proliferar (TUOMOLA et al. 2001, BURITI et al. 2005). A maior parte dos estudos sobre ação dos probióticos ignora esses fatos e dados sobre a tolerância de probióticos às secreções do intestino delgado, além da bile, não são avaliados (KOS et al., 2000).

O desenvolvimento de queijo potencialmente probiótico a partir de leite de cabra justifica-se em função do potencial de mercado, do alto valor agregado atribuído aos alimentos funcionais e da possibilidade de inserção de produtos lácteos caprinos nesse segmento. Do ponto de vista do consumidor, a diversificação da oferta de produtos probióticos é importante para favorecer a ingestão da quantidade necessária para uma ação benéfica efetiva.

Os queijos fabricados na região Nordeste, principalmente na forma artesanal, estão entre os produtos lácteos mais consumidos no Estado do Ceará. O uso de leite de cabra com teor elevado de CLA para a produção de queijo deve resultar em produto com maior concentração desse grupo de ácidos graxos, potencializando os atributos funcionais do produto. Além disso, a utilização de leite de cabra com perfil de ácidos graxos modificado e teor elevado de CLA introduz outras variáveis no desenvolvimento de queijo probiótico, com efeitos ainda não investigados diretamente.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* em queijos de leite de cabras, alimentadas com dieta controle e com dieta especial para aumento da concentração de CLA, sob condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal humano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de leite de cabra com teor elevado de CLA

A produção do leite destinado à fabricação dos queijos foi realizada na Embrapa Caprinos. A dieta para as cabras foi formulada para atender às exigências nutricionais para produção de 2 litros/dia conforme exigências do NRC (2007). Para os animais que produziram o leite não modificado, os ingredientes utilizados foram feno de capim-tifton, milho moído e farelo de soja, sendo que para os animais que produziram o leite rico em ácido linoléico conjugado o milho foi parcialmente substituído por óleo de soja na proporção de 3,5% da dieta total conforme Bomfim et al. (2006). O leite rico em ácido graxo linoléico conjugado ficou disponível para o processamento a partir da segunda semana do início da alimentação das cabras, período necessário para que haja a alteração qualitativa na gordura do leite (ABUGHAZAKEH e HOLMES, 2007)

2.2 Produção dos queijos de cabra experimentais

O processamento dos queijos de cabra foi realizado na usina de processamento de leite da Embrapa Caprinos. Cerca de 200L de leite de cabra contendo CLA, obtido de animais em dieta suplementada com óleo de soja (conforme BOMFIM et al. 2006) e 200L de litros de leite convencional foram usados. Foram realizados ensaios preliminares para obtenção de concentração mínima de 10^7 UFC do probiótico/g de queijo após a prensagem. Os dois lotes de leite foram pasteurizados (65°C/ 30 min), resfriados a 35°C e usados para produção dos queijos. O probiótico usado foi *B. animalis* subsp. *lactis* (BB12, DVS, Chr. Hansen). A Tabela 1 apresenta as características de cada tipo de queijo. Detalhes das etapas de fabricação são apresentados na Figura 1.

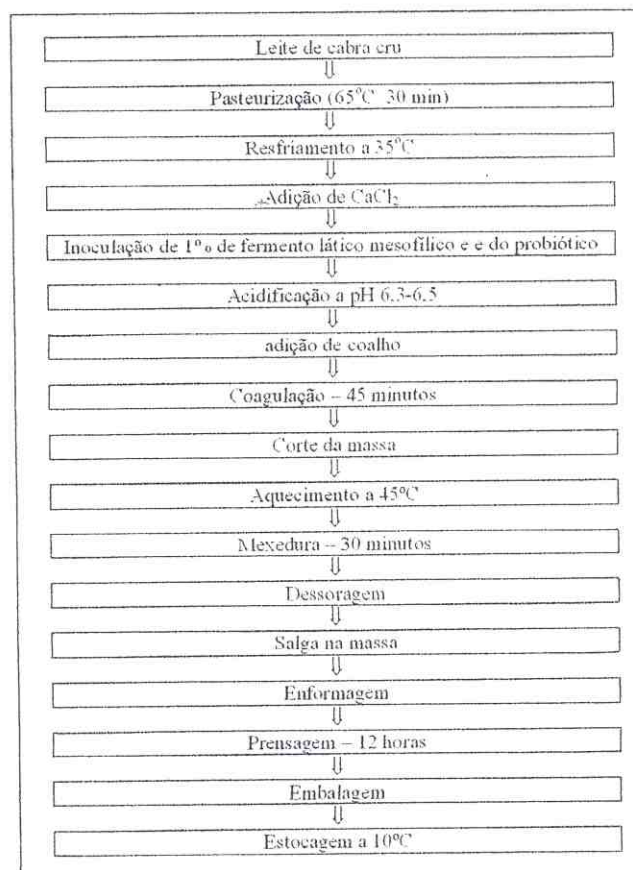


Figura 1 – Esquema da etapas principais do processamento de queijo de cabra contendo *Bifidobacterium animalis*.

Tabela 1 – Características dos queijos de cabra tipo coalho de cada tratamento

Tratamentos	Leite de cabra	Cultura probiótica
T1	Teor elevado de CLA	<i>B. animalis</i>
T2	Normal	<i>B. animalis</i>

Os lotes de leite receberam a adição de cloreto de cálcio (0,02% de solução 50%), inóculo de 1% (v/v) de fermento láctico mesofílico (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, R-704 DVS, Chr. Hansen) e do probiótico, diluído em leite estéril, para atingir contagem de 10^{10} UFC/mL no leite destinado ao processamento. Quando o pH chegou a 6,3-6,5, foi adicionado o coagulante (% de adição calculada com base no poder coagulante do coalho comercial). O coágulo foi cortado em grãos com cerca de 1,5 cm², submetido a agitação e repouso alternados para dessoragem, até que grãos ficassem firmes. Cerca de 50% do soro foi retirado, aquecido a 60°C e retornado ao tanque de forma a atingir 45°C. A mexedura continuou por 30 minutos, quando cerca de 90% do soro foi retirado. A massa recebeu adição de sal (0,8%) e se seguiu a enformagem em formas de material plástico para a obtenção de queijos com cerca de 500g. Foi feita a prensagem nas formas por aproximadamente 12 horas e, em seguida, os queijos foram desenformados, embalados a vácuo e levados à câmara de estocagem por 30 dias a 10°C.

2.3 Contagem de *Bifidobacterium animalis*

As análises foram realizadas em triplicata. Para a análise dos queijos, amostras de 25g das peças de queijo foram retiradas em condições assépticas aos 30 dias de estocagem. As porções de queijo foram homogenizadas em 225ml de água peptonada 0,1% e submetidas a diluições decimais com o mesmo diluente. A contagem de *B. animalis* nas amostras dos queijos foi feita em meio MRS-LP, após incubação em anaerobiose a 43°C por 72h (BURITI, 2005).

2.4 Avaliação da sobrevivência de bactérias probióticas no queijo de coalho após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile

A sobrevivência de *B. animalis* no queijo foi avaliada em sucos gástrico e entérico simulados após 30 dias de armazenamento, utilizando-se enzimas do trato gastrointestinal segundo metodologia modificada de Sallans et al. (1988) e Gänzle et al. (1999). Para o teste, cerca de 25g de cada amostra de queijo foram diluídas em 225mL de água peptonada 0,1%. Essa mistura foi adicionada à solução ácida pH 2,5, contendo pepsina (3g/L), e incubada a 37°C em *shaker* por 120 min com agitação de 150 rpm. Em seguida, o pH foi alterado para 5,6 por mais 120 minutos e, finalmente, alterado para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos. Nas etapas de simulação dos fluidos entéricos também adicionou-se bile (Oxgall, Oxoid) na proporção adequada para uma concentração final de 3g/L. O experimento totalizou 6 horas de ensaio (120 min para cada pH), e para a contagem de bactérias probióticas, foram retiradas alíquotas em intervalos pré-definidos de 60 e 120 min para pH 2,5 e 120 min para pH 5,6 e 7,5. Para cada tratamento foram realizadas três repetições. Para esse experimento foram preparadas duas soluções com pH 12,0 e 1,5, empregando-se para acerto do pH soluções de HCl 1N, NaOH 1N, e os sais NaCl e NaH₂PO₄·2H₂O. A mistura dessas soluções na proporção adequada resultou nos valores de pH 2,5, 5,6 e 7,5 (SALLANS et al., 1988).

A contagem de *B. animalis* foi realizada com o meio MRS-LP (BURITI, 2005) sendo a incubação realizada a 43°C por 72 horas em anaerobiose.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações de *B. animalis* nos queijos de cabra armazenados por 30 dias a 10°C podem ser observadas na Tabela 2. Nota-se que foram obtidas contagens similares em ambos os queijos, de 7,65 e 7,47 log UFC/g, respectivamente, para o queijo com alto teor de CLA e o queijo controle. Considerando para consumo uma porção diária de aproximadamente 10g a 100g de queijo, obtém-se um total de 10^8 - 10^9 células, o que está de acordo com as exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais (BRASIL 2008). Considerando ainda, que pela rotulagem do produto indica-se uma porção diária de 30g, mesmo com um consumo menor, de 10g, ainda será obtida a concentração mínima de microrganismos para a manutenção do efeito probiótico.

Tabela 2 – Contagens (log UFC/g) de *Bifidobacterium animalis* nos queijos de cabra com teor elevado de ácido linoléico conjugado (CLA) e nos queijos controle

Tipos de queijos avaliados	Contagens de <i>B. animalis</i> ² (log UFC/g)
Queijo com alto teor de CLA ¹	7,65
Queijo controle	7,47

1. CLA = ácido linoléico conjugado; 2. Média de três repetições

O valor de pH dos queijos com 30 dias de estocagem foi de 5,61 para o queijo com elevado teor de CLA e 5,15 para o queijo controle. Após a dissolução dos queijos em água peptonada e adição desta mistura na solução ácida com pH 2,5, obteve-se como valores finais pH 2,79 e 3,16 para os queijos com alto teor de CLA e controle, respectivamente, de acordo com a tabela 3. Nas etapas de simulação dos sucos entéricos, os valores de pH obtidos foram 5,82 e 5,79 para a etapa com pH 5,6, e 7,43 e 7,40 para a etapa com pH 7,5, considerando os queijos com alto teor de CLA e controle, respectivamente. Verifica-se que a mistura dos queijos nas soluções ácidas alterou ligeiramente o valor do pH das soluções utilizadas, e este fato também ocorre naturalmente no organismo humano quando o alimento mistura-se aos sucos gástrico e entérico, minimizando ou não os efeitos sobre a sobrevivência de bactérias.

Tabela 3 – Variação de pH das soluções usadas para simulação do sistema gastrointestinal

Condições	pH final da solução	
	Amostras de queijo com alto teor de CLA	Amostras de queijo com teor normal de CLA
pH2,5 - 60min	2,79 ± 0,02	3,16 ± 0,02
pH2,5 - 120min	5,82 ± 0,03	5,79 ± 0,02
pH5,6 - 240min	7,43 ± 0,01	7,40 ± 0,03

As contagens de populações sobreviventes à passagem pelo sistema gastrointestinal podem ser observadas na Figura 1. Nota-se que após 60 min em solução gástrica com pH 2,5 e pepsina (3g/L), obteve-se contagens de 6,97 e 7,32 logUFC/g para os queijos com elevado teor de CLA e controle, respectivamente. Após 120 min de ensaio em suco gástrico a população em queijo com elevado teor de CLA foi reduzida em aproximadamente 1,2 ciclos logarítmico, enquanto que a população no queijo controle manteve-se constante.

Com o início do ensaio nos sucos entéricos após a passagem pelo suco gástrico, obteve-se contagens de 4,75 e 6,83 logUFC/g após duas horas em pH 5,6 e de 4,28 e 6,20 logUFC/g após 2 horas em pH 7,5, para os queijos com elevado teor de CLA e controle, respectivamente. A etapa com pH 5,6 simula a entrada do alimento no duodeno enquanto a etapa com pH 7,5 simula a passagem para o jejuno, íleo e intestino grosso.

Considerando as populações iniciais de bifidobactérias nos queijos, houve uma redução de até 3,37 e 1,27 ciclos logarítmicos após o ensaio de simulação da passagem pelo trato gastrointestinal para os queijos com CLA e controle, respectivamente. Segundo Kurmann e Rasic (1991), a sobrevivência de 10^6 UFC/g é suficiente para exercer os efeitos benéficos à saúde, o que comprova que o queijo controle apresentou população final adequada para a veiculação de bifidobactérias após a simulação do sistema gastrointestinal. Estudos posteriores devem ser realizados com o queijo preparado com leite com alto teor de CLA para uma melhoria na sobrevivência desta bactéria após a passagem simulada pelo sistema gastrointestinal, todavia a contagem total de bifidobactérias nestas amostras antes dos testes *in vitro* estava de acordo com a legislação brasileira para alimentos funcionais (BRASIL, 2008). Atualmente, a legislação brasileira exige que as culturas utilizadas em alimentos funcionais sejam resistentes às condições gástricas e à presença de bile, mas não especifica qual a redução máxima aceitável após a realização destes testes. Diversos autores relatam que as bactérias probióticas são sensíveis a acidez e a bile em maior ou menor grau em função do gênero e espécie, sendo raras as que sobrevivem integralmente após os testes simulados com sucos gástricos e entéricos (CHARTERIS et al., 1998; TRUELSTRUP HANSEN et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2004; COLLADO et al., 2006). Neste estudo verificou-se que o alimento em que a bactéria é veiculada também influencia na sua resistência a acidez e bile.

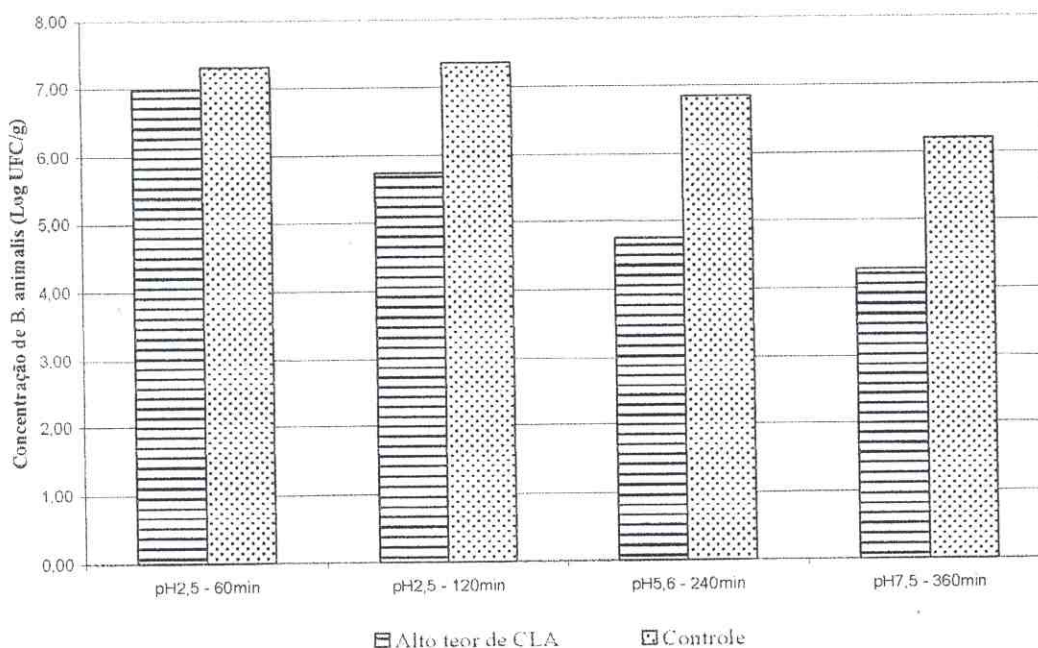


Figura 1 – Sobrevivência de *B. animalis* em queijo de cabra com alto teor de CLA e controle com 30 dias de estocagem após simulação do suco gástrico (pH 2,5 por 120 min) e entérico (pH 5,6/240min e pH 7,5/360min).

4 CONCLUSÕES

A fabricação de queijo de leite de cabra com *B. animalis* é viável tecnologicamente, com a obtenção de contagens acima de 7 log UFC/g por até 30 dias de estocagem. As bifidobactérias também resistiram à passagem simulada pelo trato gastrointestinal humano com uma população final de 6,2 log UFC/g para o queijo controle. Todavia, as contagens do probiótico após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile foram menores nas amostras de queijos feitos a partir de leite com alto teor de CLA. Esses resultados mostram que a diferença na formulação dos queijos exerceu uma influência na resistência das bactérias a acidez e bile.

5 AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo auxílio financeiro ao projeto.

SUMMARY

Higher levels of conjugated linoleic acid (CLA) and increased insaturated fatty acid contents in milk are observed in goats fed diets supplemented with soybean oil. Cheese was produced, in this study, using the milk of the goats fed the special diet to achieve high levels of CLA. It was also prepared the control cheese using milk of goat fed standard diet without soybean oil. The cheeses were added of *Bifidobacterium animalis* and evaluated after 30 days of refrigerated storage, for quantification of *B. animalis* and survival of this probiotic bacterium after treatment simulating the gastrointestinal tract. The gastric juice at pH 2.5 was added of pepsin (3g/L). The enteric juice added of bile (3g/L) was simulated with pH 5.6 and 7.5 according to the conditions of the duodenum, jejunum, ileum, and the large intestine. The counts of *B. animalis* were similar in the both types of cheese (7.65 and 7.47 log CFU/g, respectively, in the cheese containing high levels of CLA and in the control cheese). These results show that the portion of 30g of cheese contains 10^8 cells, which agree to the Brazilian legislation requirement related to the functional foods. After the assays simulating gastrointestinal conditions, the population of *Bifidobacterium animalis* were reduced to 4.28 and 6.20 log CFU/g in the cheese containing high levels of CLA and in the control cheese, respectively. Therefore, the counts of the probiotic bacterium after the action of gastric and

enteric juice prepared with pepsin and bile, respectively, were lower in the samples of the cheese containing high levels of CLA than in the control cheese.

Index terms: probiotic, goat milk, conjugated linoleic acid, CLA

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUGHAZALEH, A. A & HOLMES, L. D. Diet supplementation with fish oil and sunflower oil increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *J. Dairy Science*, v. 90, n. 6, p. 2897-2904, 2007.
- BOMFIM, M. A. D., LANNA, D. P. D., FACÓ, O., RODRIGUES, M. T., GOMES, G. M. O. F., PEREIRA, L. P. S. Efeito da manipulação dos teores de ácidos graxos sobre o potencial funcional da gordura do leite de cabra para a nutrição e saúde humanas. In: **CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE**, 9., 2006, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: FEPAL, 2006. (CD ROM).
- BOYLSTON, T. D., VINDEROLA, C. G., GHODDUSI, H. B., REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* v. 14, p. 375-387, 2004.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos*. VIII – Lista das Alegações Aprovadas. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em 15 mai. 2009.
- BURITI, F. C. A. Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 2005.
- BURITI, F. C. A., ROCHA, J. S. da, SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas frescal cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal* v. 15, p. 1279-1288, 2005.
- CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., COLLINS, J. K., Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 84, 759-768, 1998.
- COLLADO, M. C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*. v. 15, n. 4, p. 570-575, 2006.
- CORDEIRO, P. R. C. Mercado de leite de cabra e derivados. *Revista CFMV* v. 12, n. 39, p. 19-23, 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper 85*. Rome, 2006. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>.
- GÄNZLE, G. G., HERTEL, C., VOSSEN, J. M. B. M., HAMMES, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. of Food Microbiology* 48: 21-35.
- GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. Development of a probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *J. Dairy Sci.* v. 81, p. 1492-1507, 1998.
- GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 10(4/5), 139-157, 1999.
- HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. *Small Rum. Res.* v. 51, p. 155-163, 2004.
- KALAVROUZOTI, I., HATZIKAMARI, M., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N. Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. *Int. J. Dairy Techn.* v. 58, n. 1, p. 30-38, 2005.
- KONGO, J. M., GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in a controlled bioreactor. *Letters Applied Microb.* v. 42, p. 595-599, 2006.

- KOS, B.; SUSKOVIC, J.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technol. Biotechnol.*, Zagreb, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2000.
- KURMANN, J. A., RASIC, J. L., The health potential of products containing *bifidobacteria*. In R. K. Robinson (Ed.), *Therapeutic properties of fermented milks* (pp.117-158), 1991. London, UK. Elsevier.
- MATSUMOTO, M., OHISHI, H., BENNO, Y., H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. of food microbiology*, 93, 109-113, 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – Nutrient requirement of small ruminants: sheep, goat, cervids, and new camelids/Committee on Nutrient Requirement of Small Ruminant, Board on Agriculture and Natural Resource, Division on Earth and Life Studies, Washington, DC 2007.
- SALLANS, F. RODRIGUEZ, F., SABLAYROLLES, B., COMBES, A., PATAU, J.P., ROUFFIAC, R. Etude comparative de cinq specialites de théophylline a liberation prolongée. *Journal de Pharmacie Belgique* 43:81-87. 1988.
- STANTON, C., GARDINER, G., MEEHAN, H., COLLINS, K., FITZGERALD, G., BRENDAN LYNCH, P., ROSS, R.P. Market potential for probiotics. *Am. J. Clinical Nutrition* v. 73, p. 476-483, 2001.
- TAKAHASHI, N., XIAO, J. Z., MIYAJI, K., YAESHIIMA, T., HIRAMATSU, A., IWATSUKI, K. Selection of acid tolerance of bifidobacteria and evidence for a low -pH-inducible and acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy reasearch*, 71, 340-345, 2004.
- TRUELSTRUP HANSEN, L., ALLAN-WOJTAS, P. M., JIN, Y. L., PAULSON, A. T., Survival of Ca-Alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. And simulated gastrointestinal conditions. *Journal of food microbiology*, 19, 35-45, 2002.
- TUOMOLA, E., CRITTENDEN, R., PLAYNE, M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 73, p. 393S-398S, 2001.
- VINDEROLA, C. G., PROSELLO, W., GHIBERTO, D., REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.* v. 83 p. 1905-1911, 2000.