



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas adicionadas de polpa de morango e suplementadas com L-triptofano elaboradas a partir de leite bubalino e bovino

Thamires Maria Simões da Silva

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Ciências ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e para o Departamento de Ciência dos Alimentos, Nutrição e Meio Ambiente da Universidade de Milão (Programa de Dupla Titulação).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira (FCF/USP)

Co-Orientador: Prof. Dr. Diego Mora (UNIMI)

Universidade de São Paulo

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FBT/FCF/USP)

Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS-UNIMI)

São Paulo - SP

2021



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas adicionadas de polpa de morango e suplementadas com L-triptofano elaboradas a partir de leite bubalino e bovino

Thamires Maria Simões da Silva

Versão Corrigida

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Ciências ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e para o Departamento de Ciência dos Alimentos, Nutrição e Meio Ambiente da Universidade de Milão (Programa de Dupla Titulação).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira (FCF/USP)

Co-Orientador: Prof. Dr. Diego Mora (UNIMI)

Universidade de São Paulo

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FBT/FCF/USP)

Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS-UNIMI)

São Paulo - SP

2021

S158d Silva, Thamires Maria Simões
Desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas
adicionadas de polpa de morango e suplementadas com
L-triptofano elaboradas a partir de leite bubalino
e bovino / Thamires Maria Simões Silva. - São
Paulo, 2021.
128 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza
Coorientador: Mora, Diego

1. Leite de búfala. 2. Bebidas lácteas. 3.
Probióticos. 4. Triptofano. 5. Cinética de processo.
I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza,
orientador. III. Mora, Diego, coorientador.

Thamires Maria Simões da Silva

Desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas adicionadas de polpa de morango e suplementadas com L-triptofano elaboradas a partir de leite bubalino e bovino

Comissão Julgadora

da

Tese para a obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Orientador/Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2021.

Dedico essa tese aos meus pais, José Antônio e Maria de Fátima, por todo amor e apoio incondicional que me fizeram nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a força necessária para superar todas as dificuldades em minha jornada. Obrigada por estar sempre comigo e me guiar em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, por confiar no meu trabalho e no meu potencial. Agradeço todo o seu apoio, compreensão e orientação ao longo do meu doutorado. O senhor terá sempre minha admiração.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Diego Mora, por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório. Agradeço imensamente a oportunidade e conhecimento que adquiri sob sua orientação.

Aos meus pais, José Antônio e Maria de Fátima, por me amarem e apoiarem de todas as formas possível e impossíveis.

Ao meu marido, Eric, por todo amor, apoio e pela incrível paciência que demonstrou comigo ao longo de toda minha jornada. Você foi o meu alicerce nos momentos mais difíceis, terá sempre meu amor e minha gratidão.

À senhora Anna Carolina, cuja amizade se tornou, ao longo desses anos, um inesgotável motivo para eu me sentir grata. Muito obrigada pelo apoio imensurável durante todo esse processo.

Aos meus irmãos, Thaís e Matheus, por toda a amizade e companheirismo.

Às minhas sobrinhas, Maria Eduarda e Maria Beatriz, por serem a parte mais linda do meu mundo todinho.

À minha sogra Márcia, ao meu avô Cláudio e minha tia Marli, por todo amor e carinho que sempre me dedicaram. Vocês terão sempre um lugar especial em meu coração.

Às senhoras Marcela e Viviane, por toda amizade e apoio nos dias mais difíceis.

À professora Cristina Stewart Bittencourt Bogsan, por toda sua contribuição durante o projeto. Obrigada por sempre acreditar em mim e estar ao meu lado quando precisei.

À professora Suzanna Lannes, por todo aprendizado que recebi e por me inspirar quanto ao tipo profissional eu quero ser.

Aos professores Fancesco Molinari, Stefania Arioli e Attilio Converti por sempre me fornecerem suporte quando precisei.

Aos meus colegas de laboratório e de trabalho: Anna Carolina, Thaís, Viviane, Sabrina, Wellinson, Amanda, Carlos, João, Caroline, Raquel, Sara e Paulo.

Aos amigos que fiz durante minha permanência na Universidade de Milão: Igor, Giorgia, Giulia, Dea, Rossella e Elena. Agradeço toda ajuda, carinho e amizade de vocês. Grazie mille!

À Maria do Rosário, por toda sua amizade e companheirismo. Muito obrigada pela sua paciência e por ser uma excelente companheira de viagem.

À todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que contribuíram para o meu aprendizado durante esse período.

A todos os funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Alexandre, Nilton, Tânia e Rose. Muito obrigada pela paciência e por toda ajuda nos momentos em que precisei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o meu doutorado.

A todos os que contribuíram de forma direta e indireta para que esse trabalho se realizasse, agradeço de coração.

RESUMO

Silva, T. M. S. **Desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas adicionadas de polpa de morango e suplementadas com L-triptofano elaboradas a partir de leite bubalino e bovino.** 2021. 129f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação de bebida láctea bubalina probiótica adicionada de polpa de morango, comparando os efeitos do uso do leite de búfala e de vaca na elaboração dos produtos e verificando a possibilidade de suplementação com triptofano nos produtos lácteos probióticos. Como primeira etapa do trabalho, bebidas lácteas probióticas foram elaboradas a partir de leite bubalino e bovino, fermentadas com *Streptococcus thermophilus* TA040, *Lactobacillus bulgaricus* LB340 e *Lactobacillus acidophilus* La5, e formuladas com 0, 25 e 50% de soro em sua formulação. As bebidas foram avaliadas quanto à cinética de fermentação das culturas lácticas utilizadas, ao teor de proteína, gordura e sólidos totais não gordurosos, pós-acidificação, viabilidade das culturas fermentadoras e sua capacidade de sobrevivência ao estresse gastrointestinal *in vitro*. As bebidas lácteas bubalinas apresentaram resultados superiores as bebidas bovinas. O uso do leite de búfala na elaboração das bebidas lácteas promoveu benefícios quanto as culturas lácticas presentes nos produtos, exercendo efeito protetivo e influenciando na preservação da viabilidade das bactérias ao longo do armazenamento refrigerado e durante a simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*. As bebidas lácteas elaboradas com 25% apresentaram os resultados mais próximos aos obtidos pelos produtos controle, sem adição de soro, sendo selecionadas para a segunda parte do estudo. Nesta etapa, as formulações de bebida láctea com 25% de soro, foram acrescidas de um preparado com polpa de morango e bebidas sem adição da fruta, utilizadas como controle. As bebidas lácteas bubalinas frutadas, apresentaram menor teor de gordura e melhores características reológicas, com maior viscosidade e consistência do que os produtos controle, sem afetar a pós-acidificação, o perfil de ácido graxo, assim como, a viabilidade e a resistência às condições de estresse gastrointestinal *in vitro* das culturas fermentadoras. A avaliação da possibilidade de suplementar lácteos probióticos com triptofano foi realizada em conjunto com a Universidade de Milão. Para isso, iogurtes probióticos receberam adição de triptofano antes ou após a fermentação, sendo avaliados com relação ao perfil de pós-acidificação, quantidade de triptofano nos produtos, número de células viáveis por plaqueamento e citometria de fluxo ao longo do armazenamento a 25° e 4°C. Complementarmente, a influência da presença do triptofano no crescimento e produção de compostos antimicrobianos pelas culturas lácticas, também foi avaliada. A adição de triptofano após a fermentação dos iogurtes, que foram armazenados sob refrigeração (4°C), além de não afetar a pós-acidificação dos produtos, apresentou benefícios quanto a viabilidade *L. acidophilus*, redução do dano e aumento do número de células vivas, promovendo teor maior do aminoácido nos iogurtes. A presença do triptofano nos meios de cultivo, também influenciou de forma positiva o crescimento de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, melhorando o desenvolvimento das bactérias durante a fermentação e influenciando em uma maior atividade antilisterica por parte do *S. thermophilus*. Diante da influência positiva da aplicação do leite de búfala na elaboração das bebidas lácteas, assim como, a adição do triptofano em iogurtes probióticos, a suplementação do aminoácido em bebidas lácteas bubalinas frutadas permitiria a obtenção de um produto funcional, onde seus benefícios estariam relacionados tanto ao consumo do probiótico presente no produto quanto a complementação de triptofano na dieta do consumidor.

Palavras-chave: Leite de búfala, bebidas lácteas, probióticos, triptofano, cinética de processos.

ABSTRACT

Silva, T. M. S. **Development of probiotic dairy beverages with strawberry pulp and supplemented with L-tryptophan from buffalo and bovine milk.** 2021. 123f. Thesis (PhD) – School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

The aim of this study was to develop a formulation of probiotic buffalo dairy beverage added with strawberry pulp, comparing the effects of using buffalo and cow's milk in the preparation of products and verifying the possibility of tryptophan supplementation in probiotic dairy products. As a first stage of the work, probiotic dairy beverages were made from buffalo and bovine milk, fermented with *Streptococcus thermophilus* TA040, *Lactobacillus bulgaricus* LB340 and *Lactobacillus acidophilus* La5, and formulated with 0, 25 and 50% whey in their formulation. The beverages were evaluated for the fermentation kinetics of the used lactic cultures, the levels of protein, fat and total no fat solids, post-acidification, fermenting cultures viability and their ability to survive gastrointestinal stress *in vitro*. Buffalo milk use in dairy beverages production promoted benefits regarding the lactic cultures present in the products, exerting a protective effect and influencing the viability preservation of bacteria during the cold storage and simulation of gastrointestinal stress *in vitro*. Dairy beverages made with 25% whey addition showed results similar to those obtained by the control products, without whey addition, being selected for the second part of the study. In this part, the dairy beverages formulations with 25% whey, were added with a preparation were added with a strawberry pulp preparation and dairy beverages without added fruit, used as a control. Fruity bubaline dairy beverages had lower fat content and better rheological characteristics, with higher viscosity and consistency than control products, without affecting post-acidification, fatty acid profile, as well as viability and resistance to *in vitro* gastrointestinal condition of fermented cultures. The possibility of supplementing probiotic dairy products with tryptophan was evaluated in partnership with the University of Milan. For this, probiotic yogurts received the addition of tryptophan before or after fermentation, being evaluated in relation to the post-acidification profile, tryptophan amount in the products, viable cell number per plating and flow cytometry during storage at 25°C and 4°C. In addition, the influence of the tryptophan presence on the growth and production of antimicrobial compounds by lactic cultures was also evaluated. The addition of tryptophan after the yogurt fermentation, which were stored under refrigeration (4°C), in addition to not affecting the post-acidification of the products, showed benefits to the viability of *L. acidophilus*, reduced the damage and increased the number of cells promoting higher amino acid content in yogurts. Tryptophan presence in the culture media also positively influenced the growth of *S. thermophilus* and *L. acidophilus*, improving the development of bacteria during fermentation and influencing better antilisteric activity in the part of *S. thermophilus*. In view of the buffalo milk positive influence observed after the application in dairy beverage preparation, as well as the addition of tryptophan in probiotic yoghurts, amino acid supplementation in fruity buffalo dairy beverages would allow to obtain a functional product, where its benefits would be related both to the consumption of the probiotic present in the product as to the supplementation of tryptophan in the consumer's diet.

Keywords: Buffalo milk, milk drink, probiotics, tryptophan, process kinetics.

RIASSUNTO

Silva, T. M. S. **Sviluppo di bevande a base di latte probiotiche aggiunte con nettare di fragola e integrate con L-triptofano a base di latte di bufala e latte bovino.** 2021. 123f. Tesi (Douttorato) – Facoltà di Scienza Farmaceutiche, Università di San Paolo, San Paolo, 2021.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare diverse formulazioni di una bevanda probiotica a base di latte vaccino o di bufala aggiunta con nettare di fragola verificandone la possibilità di integrazione con triptofano e ceppi di batteri lattici potenzialmente probiotici. A tal fine, in una prima fase del lavoro, sono state prodotte bevande a base di latte vaccino e di bufala, fermentate con ceppi selezionati di *Streptococcus thermophilus* TA040, *Lactobacillus bulgaricus* LB340 e *Lactobacillus acidophilus* La5, formulate con l'aggiunta di diverse quantità di siero di latte (0,25 e 50%). Il processo di fermentazione è stato seguito monitorando la crescita dei microrganismi. Al termine della fermentazione sono stati valutati il contenuto di proteine, grassi e solidi diversi dai grassi totali, la post-acidificazione, la vitalità delle colture microbiche utilizzate nel processo di fermentazione e la loro capacità di sopravvivere allo stress gastrointestinale in vitro. Le bevande fermentate ottenute con latte di bufala hanno mostrato un maggiore effetto protettivo sulla vitalità dei microrganismi durante la conservazione a freddo (4 °C) e durante la simulazione dello stress gastrointestinale in vitro, rispetto a quanto mostrato per le bevande fermentate a base di latte vaccino. Le bevande a base di latte formulate con il 25% di siero di latte hanno mostrato i risultati simili a quelle di controllo in cui non era prevista l'aggiunta di siero di latte. Le bevande formulate con il 25% di siero di latte hanno previsto anche l'aggiunta di nettare di fragola e hanno mostrato un contenuto di grassi inferiore e migliori caratteristiche reologiche, con viscosità e consistenza maggiore in rispetto ai prodotti di controllo, senza influenza significativa sulla post-acidificazione, sul profilo degli acidi grassi, nonché la vitalità e la resistenza alle condizioni di stress gastrointestinale in vitro delle colture di fermentazione. L'integrazione delle bevande fermentate con L-triptofano è stata valutata in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze per gli Alimenti la Nutrizione e l'Ambiente. La supplementazione con L-triptofano è stata prevista prima o dopo il processo fermentativo valutando il profilo di post-acidificazione, la quantità di triptofano residua nei prodotti, il numero di cellule vitali mediante citometria a flusso durante la conservazione a 25°C e 4°C. Quando L-triptofano veniva aggiunto prima della fermentazione, si è proceduto alla valutazione di eventuali suoi effetti sulla crescita microbica e sulla produzione di composti antimicrobici da parte dei ceppi responsabili del processo di fermentazione. La presenza di triptofano in fase di fermentazione ha influenzato positivamente la crescita di *S. thermophilus* e *L. acidophilus* e migliorato l'attività nei confronti di *L. monocytogenes* esercitata da *S. thermophilus*. Quando L-triptofano veniva addizionato al termine del processo di fermentazione, durante la conservazione a 4 °C non sono stati evidenziati fenomeni di post-acidificazione, mentre si è avuto un significativo miglioramento dei livelli di vitalità di *L. acidophilus* rispetto ai campioni di controllo.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro di ricerca, sono state valutate positivamente sia l'impiego di latte di bufala nella produzione di bevande fermentate, che l'aggiunta di L-triptofano che consentirebbe l'ottenimento di prodotti funzionali dove i benefici sarebbero correlati sia al consumo di microrganismi probiotici che all'integrazione di un aminoacido essenziale, l'L-triptofano, nella dieta del consumatore.

Parole-chiavi: latte di bufala, bevanda a base di latte, probiotici, triptofano, cinetica di processo.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Delineamento experimental tipo compósito central (CCD) para a elaboração de bebidas lácteas probióticas com polpa de morango.....11

Tabela 2. Parâmetros da cinética do processo fermentativo *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (La5) em leite bubalino e bovino a 42°C até pH 4,7.....16

Tabela 3. Quantidade de gordura, proteína e sólidos totais não gordurosos das bebidas lácteas e dos leites utilizados para sua elaboração.....14

Tabela 4. Valores de pH das bebidas lácteas em um (d1), sete (d7), catorze (d14) e vinte e um (d21) dias após a fermentação.....18

Tabela 5. Contagens de bactérias viáveis (logUFC/mL) em bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La) após um (d1), sete (d7), catorze (d14) e vinte e um (d21) dias após a fermentação.....20

Capítulo 3

Tabela 1. Delineamento experimental para a elaboração de bebidas lácteas probióticas com polpa de morango.....11

Tabela 2. Quantidade de gordura e proteína das bebidas lácteas e dos leites utilizados para sua elaboração.....14

Tabela 3. Valores de pH das bebidas lácteas obtidos em um (d1), sete (d7), catorze (d14) e vinte e um (d21) dias após a fermentação.....16

Tabela 4. Parâmetros reológicos das bebidas lácteas probióticas para os modelos de Ostwald-de Walle, Bingham e Herschel Bulkley.....18

Tabela 5. Perfil de ácido graxo das bebidas lácteas probióticas elaboradas a partir de leite de búfala e de vaca.....20

Capítulo 4

Tabela 1. Delineamento experimental para a elaboração de iogurtes probióticos suplementados com L-triptofano.....11

Tabela 2. Espectro de inibição dos BLIS produzidos pelas cepas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, quando cultivados nos meios MRS, M17, LAPTg com e sem adição de triptofano.....14

Tabela 3. Contagem de bactérias totais por citometria de fluxo dos iogurtes ao longo do armazenamento a 25°C e 4°C.....16

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1.** Curva de acidificação da fermentação por *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (La5) em leite bubalino e bovino a 42°C até pH 4,7. Onde: a) valores de pH; b) dpH/dt com os valores de velocidade de acidificação.....17
- Figura 2.** Curva de desenvolvimento das culturas lácticas durante a fermentação de leite bubalino e bovino a 42°C até pH 4,7. Onde: a) *Streptococcus thermophilus*; b) *Lactobacillus bulgaricus*; c) *Lactobacillus acidophilus*.....19
- Figura 3.** Contagem do número de bactérias viáveis em bebidas lácteas ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado 4°C. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*.....21
- Figura 4.** Contorno mostrando o desempenho das bebidas lácteas quanto a população de bactérias viáveis ao final de 21 dias de armazenamento refrigerado 4°C. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; 1) LB1; 2) LB2; 3) LB3; 4) LV1; 5) LV2; 6) LV3.....24
- Figura 5.** Viabilidade das culturas fermentadoras em bebidas lácticas durante a simulação gastrointestinal *in vitro*. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; F0 – tempo zero, antes do início da análise; F1- fase gástrica (2 horas); F2 - primeira fase entérica (4 horas); F3 - segunda fase entérica (6 horas).....25
- Figura 6.** Contorno mostrando a população das culturas lácteas ao final da análise de simulação de estresse gastrointestinal *in vitro*. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; 1) LB1; 2) LB2; 3) LB3; 4) LV1; 5) LV2; 6) LV3.....24

Capítulo 3

- Figura 1.** Fluxograma de preparo das bebidas lácteas probióticas elaboradas. Onde: (LB1) bebida láctea bubalina controle; (LB2) bebida láctea bubalina com polpa de morango; (LV1) bebida láctea bovina controle; (LV2) bebida láctea bovina com polpa de morango.....17
- Figura 2.** Tixograma das bebidas lácteas e seus controles, após 7 dias de armazenamento a 4°C. Onde: a) bebida láctea bubalina controle (LB1); b) bebida láctea bubalina com polpa de morango (LB2); c) bebida láctea bovina controle (LV1); b) bebida láctea bovina com polpa de morango (LV2).....19

Figura 3. Contagem do número de bactérias viáveis em bebidas lácteas ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado 4°C. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*. LB1) bebida láctea bubalina controle; LB2) bebida láctea bubalina adicionada de polpa de morango; LV1) bebida láctea bovina controle; LV2) bebida láctea bovina adicionada de polpa de morango.....21

Figura 4. Contagem do número de bactérias viáveis em bebidas lácteas durante a simulação gastrointestinal in vitro. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; F0 – tempo zero, antes do início da análise; F1- fase gástrica (2 horas); F2 - primeira fase entérica (4 horas); F3 - segunda fase entérica (6 horas).....24

Capítulo 4

Figura 1. Curva de crescimento das culturas fermentadoras realizada através da leitura de absorbância (600 nm) em leitor de microplaca durante 24h a 37°C, utilizando meio de cultivo LAPTg suplementado com lactose, maltose ou glucose, acrescidos ou não de triptofano 0,5% (m/v). Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*.....17

Figura 2. Perfil de pós acidificação dos iogurtes elaborados ao longo do armazenamento a 25°C e 4°C. Onde: IG: iogurte controle; IG FT: iogurte fermentado com triptofano; IG T: iogurte adicionado de triptofano).....19

Figura 3. Viabilidade das culturas fermentadoras nos iogurtes ao longo do armazenamento a 25°C e 4°C. Onde: a) *S. thermophilus* (St); b) *L. bulgaricus* (Lb); c) *L. acidophilus* (La).....21

Figura 4. Quantificação do triptofano nos iogurtes adicionados de triptofano e seu controle após 1 e 7 dias de armazenamento a 25°C e 1, 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 4°C. Onde: IG: iogurte controle; IG FT: iogurte fermentado com triptofano; IG T: iogurte adicionado de triptofano.....24

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
APRESENTAÇÃO	
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 1	5
Revisão de Literatura	6
Leite de búfala.....	6
Bebida láctea.....	8
Probióticos.....	10
Triptofano.....	12
Referências bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 2	20
“Efeito da matriz láctea e do teor de soro na elaboração de bebidas lácteas probióticas produzidas a partir de leite bubalino e bovino.”	21
1. Introdução	22
2. Materiais e métodos	23
2.2.1. Preparo da matriz fermentada.....	23
2.2.2. Desenho experimental e preparação das bebidas lácteas.....	25
2.2.3. Determinação de gordura, extrato seco total desengordurado e proteína.....	26
2.2.4. Pós-acidificação.....	27
2.2.5. Enumeração de bactérias viáveis.....	27
2.2.6. Avaliação do estresse gastrointestinal <i>in vitro</i> em modo estático.....	28
3. Análises estatísticas.....	28
4. Resultados e Discussão.....	29
5. Conclusão.....	45
6. Referências bibliográficas.....	45
CAPÍTULO 3	49
“Caracterização de bebidas lácteas probióticas elaboradas a partir de leite bubalino e bovino adicionada de polpa de morango.”	50
1. Introdução	51
2. Materiais e métodos	52

2.2.1. Elaboração das bebidas lácteas.....	53
2.2.2. Determinação de gordura e proteína.....	55
2.2.3. Perfil de pós-acidificação.....	56
2.2.4. reologia.....	56
2.2.5. Perfil de ácidos graxos	57
2.2.6. Enumeração de bactérias viáveis.....	58
2.2.7. Avaliação do estresse gastrointestinal <i>in vitro</i> em modo estático.....	58
3. Análises estatísticas.....	59
4. Resultados e Discussão.....	59
5. Conclusão.....	80
6. Referências bibliográficas.....	81
CAPÍTULO 4	85
“Avaliação do efeito da suplementação de L-triptofano em iogurtes probióticos e em suas culturas fermentadoras.”	86
1. Introdução	87
2. Materiais e métodos	88
2.2.1. Avaliação do efeito da presença de triptofano e de diferentes fontes de carbono no crescimento bacteriano.....	88
2.2.2. Determinação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de célula (SLC).....	89
2.2.3. Suplementação de Triptofano em iogurte.....	89
2.2.4. Perfil de pós-acidificação.....	91
2.2.5. Viabilidade das culturas fermentadoras.....	91
2.2.6. Contagem de células totais por citometria de fluxo.....	91
2.2.7. Determinação do L-Triptofano por cromatografia de troca iônica.....	92
3. Análises estatísticas.....	92
4. Resultados e Discussão.....	93
5. Conclusão.....	108
6. Referências bibliográficas.....	109
CONCLUSÕES FINAIS	113

INTRODUÇÃO

Diante do crescente interesse por uma alimentação equilibrada e um estilo de vida mais saudável, os alimentos funcionais ganham cada vez mais espaço dentro do mercado consumidor, incentivando o desenvolvimento de produtos que atendam essa demanda e forneçam benefícios a saúde. Os alimentos funcionais, quando consumidos regularmente dentro da dieta, além da nutrição básica, proporcionam ao consumidor efeitos metabólicos e fisiológicos relacionados a manutenção da saúde (Lima, 2017). Dentre os produtos funcionais, os derivados lácteos probióticos, como iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas, apresentam grande atratividade ao consumo, ótima aceitabilidade e a possibilidade de serem inseridos em uma dieta equilibrada (Mathias *et al.* 2013, Silva, 2015).

As bebidas lácteas são produtos com alto valor nutricional, possuem características sensoriais parecidas com o iogurte e são resultantes da mistura de uma base láctea ao soro de leite (Simeoni *et al.*, 2014; Silva, 2015). A utilização do leite bubalino como base para o desenvolvimento de bebidas lácteas permite agregar maior valor nutricional ao produto, além de valorizar o conceito de produzir um alimento lácteo de alto valor agregado, pois, quando comparado ao leite de vaca, o leite de búfala possui maiores teores de gordura e proteína, o que propicia uma melhor qualidade do coágulo e uma textura diferenciada aos seus derivados (Rocha, 2008; Mathias *et al.* 2013; Guimarães *et al.*, 2015). Ademais, o uso de soro de leite na sua elaboração faz do incentivo a produção de bebidas lácteas um aliado ao aspecto ambiental, pois o soro de leite é um subproduto gerado por indústrias de laticínios e considerado um agente poluidor, por conter uma alta quantidade de substâncias orgânicas. Em particular, a utilização do soro de leite bubalino é a alternativa mais viável para o reaproveitamento desse subproduto o que, além de contribuir de forma benéfica ao ambiente, agrega ao produto fermentado qualidade nutricional e tecnológica (Costa *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2013; Silva, 2015).

As bebidas lácteas probióticas são caracterizadas por possuírem em sua composição microrganismos probióticos, conhecidos por proporcionarem benefícios a saúde do hospedeiro quando consumidos em quantidades adequadas (Hill *et al.*, 2014; ANVISA, 2018). Os benefícios associados ao consumo regular de produtos probióticos são relacionados, principalmente, no trato gastrointestinal do ser humano, atuando no equilíbrio da microbiota, na regulação do trânsito intestinal, melhora da imunidade e na manutenção da saúde geral do hospedeiro. No intestino, os micro-organismos probióticos criam uma barreira contra possíveis patógenos, dificultando sua proliferação através da competição por sítios de adesão, competição por nutrientes e o estímulo da resposta imune (Parker *et al.*, 2018).

As bebidas lácteas podem receber a adição de polpa de frutas que, além de contribuírem de forma positiva no que diz respeito à qualidade funcional e nutricional do produto, pois representam fonte de vitaminas e compostos bioativos, proporcionam ao produto sabor e aroma e melhoram sua aceitabilidade sensorial frente ao consumidor. Em especial, o morango é uma das frutas mais aplicadas para aromatizar produtos lácteos fermentados por propiciar aos produtos maior aceitação sensorial e mercadológica (Siqueira *et al.*, 2013). Adicionalmente, é uma fruta que exibe grande potencial antioxidante, devido a presença de compostos bioativos como o ácido elágico e fisetina, biomoléculas que estão despertando interesse devido aos seus potenciais anticarcinogênicos e sua capacidade de maturação das células neurais, respectivamente (Siqueira *et al.*, 2013; Silva, 2015).

A aceitabilidade e a facilidade de inserir as bebidas lácteas probióticas dentro de uma dieta saudável, fazem com que a suplementação desses produtos com nutrientes importantes ao organismo humano, como o triptofano, se mostre possível (Zenello, 2012). O triptofano é um aminoácido essencial e é o precursor do neurotransmissor serotonina, que atua diretamente no sistema nervosa central regulando fatores comportamentais como ansiedade, compulsões alimentares, agressividade e impulsividade. Uma vez que obtemos o triptofano exclusivamente através dos alimentos, uma dieta deficiente pode provocar baixos níveis de serotonina no organismo e, conseqüentemente, o possível desenvolvimento de psicopatologias com estresse, crises de ansiedade, insônia, depressão e desordens alimentares (Zappellini, 2002; Zenello, 2012).

Assim, a suplementação de triptofano em lácteos fermentados probióticos, como iogurtes e bebidas lácteas, pode atuar como um complemento nutricional, suprimindo possíveis deficiência desse aminoácido pelo indivíduo, além de poder proporcionar os possíveis benefícios a saúde do consumidor, relacionados ao consumo de probióticos.

APRESENTAÇÃO

Essa tese está organizada em capítulos que mostram a evolução de cada etapa da pesquisa realizada. Os capítulos estão descritos abaixo:

Capítulo 1: Revisão de literatura

Esse capítulo aborda, de forma objetiva, os assuntos de maior destaque que são discutidos ao longo da tese, trazendo as informações necessárias para o melhor entendimento dos demais capítulos.

Capítulo 2: “Efeito da matriz láctea e do teor de soro na elaboração de bebidas lácteas probióticas produzidas a partir de leite bubalino e bovino.”

Nesse capítulo é avaliado o efeito do tipo de leite utilizado, bubalino ou bovino, e do teor de soro de leite aplicados na elaboração de bebidas lácteas probióticas quanto aos parâmetros cinéticos fermentativos, químicos, pós-acidificação, viabilidade das culturas fermentadoras (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) e sua resistência ao estresse gastrointestinal *in vitro* ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado.

Capítulo 3: “Caracterização de bebidas lácteas probióticas elaboradas a partir de leite bubalino e bovino adicionada de polpa de morango.”

Nesse capítulo é avaliado o efeito da adição de polpa de morango às bebidas lácteas elaboradas a partir de leite bubalino e bovino, que foram caracterizadas quanto aos seus teores de gordura e proteína, perfil de pós-acidificação, perfil de ácidos graxos, reologia, viabilidade das bactérias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) e capacidade de sobrevivência a simulação do estresse gastrointestinal *in vitro* ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado.

Capítulo 4: “Avaliação do efeito da suplementação de L-triptofano em iogurtes probióticos e em suas culturas fermentadoras.”

Nesse capítulo foi avaliada a possibilidade de suplementação de triptofano em produtos lácteos, analisando, inicialmente, o efeito do aminoácido em iogurtes probióticos quanto a possíveis alterações nos produtos e em suas culturas fermentadoras. Para isso, os iogurtes adicionados de triptofano foram testados quanto ao perfil de pós-acidificação, quantidade de triptofano, número de células viáveis por plaqueamento e citometria de fluxo ao longo do armazenamento a 25° e 4°C. Adicionalmente, as culturas fermentadoras (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) foram avaliadas quanto ao efeito da presença do triptofano no seu crescimento e produção de compostos antimicrobianos.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve, como objetivo, desenvolver uma formulação de bebida láctea bubalina probiótica adicionada de polpa de morango, comparando os efeitos do uso do leite de búfala e de vaca na elaboração dos produtos e verificando a possibilidade de suplementação com triptofano.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do uso do leite bubalino na elaboração de bebidas lácteas probióticas, em comparação com o leite bovino, com diferentes teores de soro de leite, quanto a cinética de fermentação das culturas lácticas utilizadas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*), teores de proteína, gordura e sólidos totais não gordurosos, pós-acidificação, viabilidade das culturas fermentadoras e sua capacidade de sobrevivência ao estresse gastrointestinal *in vitro*.
- Avaliar o efeito da adição de polpa de fruta de morango às bebidas lácteas probióticas bubalina e bovinas, nas condições determinadas anteriormente, e caracterizar os produtos quanto ao teor de gordura e proteína, pós-acidificação, perfil da composição de ácidos graxos, parâmetros reológicos, viabilidade das culturas fermentadoras e sua capacidade de sobrevivência a simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*.
- Avaliar a influência da presença do triptofano no crescimento e produção de compostos antimicrobianos pelas bactérias *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*.
- Avaliar a influência da suplementação de triptofano em produtos lácteos, através da adição do aminoácido em iogurtes probióticos, nos parâmetros de pós-acidificação, quantidade de triptofano nos produtos, número de células viáveis por plaqueamento e citometria de fluxo.

• **CAPÍTULO** •

1

1. REVISÃO DE LITERATURA

Leite de búfala

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) foi originado a partir do búfalo selvagem que habitava a região ao norte da Índia e se expandiu pelo mundo, correspondendo atualmente a um rebanho de quase 200 milhões de cabeças e apresentando um crescimento anual de cerca de 12% (Coelho, 2019). A maior parte dessa população bubalina é encontrada na Ásia, cerca de 97%, seguida da África (1,68%), América (0,69%) Europa (0,2%) e Oceania, que não possui uma contribuição significativa nessa população (FAO, 2017; Coelho, 2019).

Os búfalos domésticos são classificados em dois grandes grupos, búfalos do pântano (*B. bubalis carabensis*) e búfalos do rio (*B. bubalis bubalis*). Os búfalos do pântano são animais que produzem pouco leite, assim sua criação é destinada para produção de carne e para trabalho animal, como na agricultura, em plantações de arroz. Já os búfalos do rio, são reconhecidos por sua aptidão a produção de leite, englobando as principais raças leiteiras, dentre elas a Murrah (Pitacas e Rodrigues, 2013). A raça Murrah é originária da Índia, tendo registros iniciais na região de Deli. As búfalas desta raça apresentam pelagem escura e chifres curtos em espirais e são reconhecidas por sua boa produtividade, sendo uma das raças consideradas como as mais importantes para a produção de leite. Esses atributos promoveram uma expansão acelerada da raça pela Índia e para outros países, ganhando destaque em vários países, inclusive no Brasil (Pitacas e Rodrigues, 2013; Coelho, 2019).

A bubalinocultura vem evoluindo no Brasil desde seu início há cerca de 100 anos, quando os animais começaram a ser introduzidos pelo norte do país, chegando a apresentar um crescimento de 301% na produção de leite só nos últimos 50 anos (Jorge *et al.*, 2011; Simões, 2014). Esse crescimento se deve a criação de búfalas apresentar vantagens, principalmente quanto a produção de carne e leite, quando comparada a criação de bovinos (Simões, 2014). O país já conta com um efetivo de mais de 1,300 milhões de cabeças de búfalos, onde os maiores rebanhos se concentram na região norte do país (66%) e na região sudeste (13%) (IBGE, 2017). Embora, apenas 17% desse rebanho seja destinado a bubalinocultura leiteira, o Brasil registrou aumento de 872% na captação de leite entre 2001 e 2018, com produção de 83,5 milhões de litros de leite somente em 2016 (Bernardes, 2019).

A crescente aceitação e procura por produtos elaborados a partir de leite de búfala, incentivam quase toda a produção bubalino leiteira brasileira, cerca de 85%, a ser destinada para a indústria de laticínios. Sua composição distinta, como elevados teores de gordura e proteína, fazem o leite bubalino apresentar alto rendimento na produção de derivados, além de resultar em produtos de

alto valor agregado, atraindo a atenção e investimento do mercado (Costa, 2017; Bernardes, 2019).

Quando comparado com o leite de vaca, o leite de búfala apresenta alta qualidade nutricional e características que se sobressaem quanto ao teor de gordura, proteína, lactose e alguns minerais (cálcio, fósforo, magnésio e ferro), possuindo teores menores de colesterol e quase o dobro de CLA (ácido linoléico conjugado). Sensorialmente, o leite bubalino apresenta uma coloração branca intensa, que se deve pela ausência de β -carotenos convertidos em retinol pela maior atividade da peroxidase, e um sabor adocicado, resultante da presença elevada de lactose (Ahmad *et al.*, 2013; Pignata *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2015).

A gordura é um dos principais componentes no leite e seu teor elevado é uma característica do leite bubalino, sendo ainda o único componente a ter o valor mínimo (4,5%) estabelecido pela Secretaria de Abastecimento e Agricultura (SAA) do estado de São Paulo (Rocha, 2008). No Brasil, o leite bubalino apresenta uma média de 5,5% de teor de gordura, podendo chegar a 10,5%, porém possui uma concentração de colesterol cerca de 30% a 70% menor que o leite bovino, embora esse possua de 3% a 3,5% de gordura apenas (Simões, 2014). Adicionalmente, sua composição de ácidos graxos insaturados pode ser considerada benéfica ao consumo o que, juntamente aos baixos níveis de colesterol, pode facilmente ser introduzido em uma dieta saudável tanto na forma *in natura* quanto através dos seus derivados (Pignata *et al.*, 2014, Andrade, 2015).

Os teores médios de proteínas presentes no leite de búfala variam de 3,8% a 4,5%, sendo composto por cerca de 77% de caseínas e 23% de proteínas do soro (Andrade, 2015). A porção proteica do leite de búfala está diretamente relacionada com sua qualidade e maior rendimento na produção de derivados, pois a quantidade elevada da caseína que permite naturalmente aos seus derivados um coágulo de melhor qualidade contribuindo para a consistência e viscosidade dos produtos (Rocha, 2008; Mathias *et al.*, 2013). A caseína está presente no leite na forma de micelas, as quais no leite bubalino se apresentam em um diâmetro maior do que no leite bovino, proporciona a formação de coágulos mais firmes e com menos água durante a formação da coalhada, o que proporciona melhor rendimento e qualidade superior aos seus derivados (Simões, 2014; Rocha, 2008)

O uso do leite de búfala para a elaboração de derivados lácteos é justificado pelas vantagens que este tem apresentado sobre o leite de vaca tanto no quesito nutricional quanto no tecnológico, contribuindo para a possibilidade da obtenção de produtos com características distintas e uma qualidade elevada.

Bebida Láctea

As bebidas lácteas fermentadas estão conquistando cada vez mais espaço dentre os produtos que apresentam propriedades funcionais, com potencial benefício à saúde do consumidor. Com atributos sensoriais que se assemelham ao iogurte, as bebidas lácteas exibem grande aceitabilidade frente ao consumidor, tornando-se viável o investimento na elaboração de novos produtos dentro da mesma linha, principalmente quando considerado ao custo/benefício do uso do soro de leite para sua produção (Caldeira *et al.*, 2010; Simeoni *et al.*, 2014; Silva, 2015).

Em particular, a bebida láctea é o “produto resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos” (BRASIL, 2005a). As bebidas lácteas fermentadas têm como adicional à sua produção a fermentação através de cultivos específicos de micro-organismos e/ou a adição de leite fermentado (ANVISA, 2002). Sua tecnologia de produção compreende a mistura de uma base láctea fermentada, como o iogurte, ao soro de leite em proporções apropriadas, de no máximo 50%, podendo receber adição de aditivos e ingredientes permitidos, como polpas de frutas (Oliveira, 2002; Marques, 2012). A aplicação do soro de leite na produção de bebidas lácteas confere ao produto características reológicas desejáveis e melhor custo/benefício do produto, resultando em um produto mais fluido e refrescante, com maior praticidade de consumo, além de se mostrar uma das alternativas mais atraentes e rentáveis de reaproveitamento de um subproduto da indústria queijeira (Costa *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2013; Silva, 2015).

O soro de leite é um subproduto obtido através da separação da caseína e da gordura do leite através da coagulação enzimática durante a produção de queijo, representando de 80 a 90% do volume do leite e contendo cerca de 55% de seus nutrientes (Rocha, 2008; Caldeira *et al.*, 2010). Depois do conteúdo de água, a lactose é o componente nutricional encontrado em maior quantidade no soro, seguida das proteínas, minerais e lipídios, apresentando ainda componentes como ácido lático, ácido cítrico e vitaminas do grupo B (Rocha, 2008).

As proteínas presentes no soro permanecem solúveis após a precipitação da caseína e representam cerca de 20% do conteúdo proteico do leite, sendo a β -lactoglobulina e as principais proteínas desse grupo. A β -lactoglobulina é a proteína encontrada em maior quantidade no soro de leite, cerca de 50%, e possuem propriedades redutoras, sequestrantes de radicais livres e inibidoras da lipoxidação que ocorre nas lipoproteínas e artérias, conferindo benefícios ao sistema cardiovascular. A α -lactoalbumina é o segundo peptídeo em quantidade no soro, em torno de 13%, sendo capaz de ligar a certos minerais, como zinco e cálcio, auxiliando na sua absorção,

além de atuar na reparação celular, contribuindo para reparação e formação de músculos e ossos (Almeida *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013, Brasil *et al.* 2015). Segundo Lira (2009), o soro de leite bubalino apresenta teores superiores de lactose, proteína e lipídios quando comparado ao soro de leite bovino, o que mostra um grande potencial para o seu uso na elaboração de produtos lácteos.

Além do ponto de vista nutricional, o soro de leite ainda representa um grande desperdício financeiro para grande parte das indústrias de laticínios, principalmente de médio e pequeno porte, que, com a regulamentação ambiental que impede o descarte inadequado do soro, precisam arcar com o custo elevado de tratamentos de baixa eficiência. Devido à alta demanda bioquímica de oxigênio, que pode chegar a $60.000\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$, o soro de leite possui alto potencial poluente, sendo cem vezes mais prejudicial ao meio ambiente que o esgoto doméstico (Rohlfes *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2014). Quando reaproveitado, o soro de leite reduz os custos de tratamento de efluentes e, adicionalmente, agrega valor ao produto se empregado na cadeia produtiva (Silva *et al.*, 2015).

Estima-se que, no Brasil, a produção anual de soro de leite pelas indústrias queijeiras esteja em torno de 5,4 milhões de toneladas e, embora a produção de bebidas lácteas seja a principal alternativa para o reuso desse subproduto, apenas cerca de 15% é reaproveitado (Rohlfes *et al.*, 2011). O soro de leite bubalino, além de apresentar vantagens nutricionais sobre o soro de leite bovino, implica uma necessidade ainda maior de alternativas de reaproveitamento, uma vez que a maior parte do leite de búfala produzido no Brasil é destinado às indústrias queijeiras, tendo a *Mozzarella* como o principal derivado produzido e comercializado no país (Lima *et al.*, 2014).

As bebidas lácteas ainda podem contar com a adição de frutas que, além de ampliar seus possíveis benefícios ao melhorar sua qualidade nutricional, sendo fonte de vitaminas e compostos bioativos, contribui para melhorar a aceitabilidade do produto perante o consumidor, por conferir aroma e sabor ao mesmo (Siqueira *et al.*, 2013; Silva, 2015). Em particular, leites como o de cabra e de búfala podem manter em seus derivados o sabor original do leite integral, resultando em um aroma desagradável decorrente da presença de ácidos graxos de natureza volátil. Para reverter esse efeito, alguns trabalhos sugerem a redução e padronização do teor de gordura para cerca de 3%, o que representa uma perda na capacidade nutricional e tecnológica do leite. A adição de polpa de frutas pode ajudar a mascarar o aroma indesejável, melhorando sensorialmente o produto sem a necessidade de comprometer o teor de gordura e seus benefícios aos derivados (Guimarães *et al.*, 2015; Pecová *et al.*, 2019).

As frutas são reconhecidas por exercerem um papel importante na alimentação humana, representando uma ótima fonte de nutrientes, tais como vitaminas e minerais, contribuindo para uma dieta saudável e equilibrada. Adicionalmente aos benefícios nutricionais, o consumo de frutas está associado a manutenção da saúde e prevenção de doenças, como câncer e doenças

relacionadas ao sistema gastrointestinal (Quinato, Degáspari e Vilela, 2007). Em particular, o morango é uma fruta saborosa e suculenta, rica em vitamina C, A, E, B5 e B6, compostos bioativos, além de ser considerada uma fonte importante de compostos fenólicos, contribuindo assim na diminuição da ocorrência de doenças crônicas, fortalecimento do sistema imunológico e digestivo (Serra *et al.*, 2011; Kubota *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2010). A adição de polpa de morango em bebidas lácteas também é justificada devido ao grande apelo sensorial do sabor e aroma perante aos consumidores, favorecendo a aceitação mercadológica do produto (Siqueira, 2013).

Probióticos

O termo probiótico tem sua origem do grego e significa “pró-vida” (Vasiljevic & Shah, 2008). Desde o início de seu estudo, os probióticos foram associados aos lácteos fermentados pelo pesquisador russo Ylya Metchnikoff, que observou que o consumo desses produtos elevava a expectativa e qualidade de vida dos búlgaros (Lima, 2017). Atualmente, os produtos lácteos representam uma parte significativa dos produtos probióticos disponíveis no mercado mundial, sendo considerados o principal grupo de veiculadores alimentícios de probióticos (Simeoni *et al.*, 2014; Meybodi & Mortazavian, 2017). Esses produtos são caracterizados por apresentar em sua composição bactérias probióticas conhecidas por serem micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, possuem o potencial de conferir benefícios à saúde do hospedeiro (Hill *et al.*, 2014; ANVISA, 2018).

Os probióticos possuem um conhecido papel na manutenção da saúde atuando diretamente no trato gastrointestinal humano, tendo seu consumo associado a benefícios na melhora nas reações químicas, auxiliando no balanço da microbiota, melhorando a imunidade, regulando o trânsito intestinal, aliviando a intolerância a lactose, hipercolesterolemia e alergia alimentares, contribuindo também para tratamentos de doenças autoimunes e até na saúde emocional do hospedeiro (Oliveira, 2002; Souza *et al.*, 2010; Raizel, 2012, Parker *et al.*, 2018). Os prováveis mecanismos de ação dos probióticos são relacionados a formação de uma barreira contra agentes patogênicos, dificultando sua colonização no intestino, através da competição por nutrientes e sítios de adesão, inativação de toxinas e receptores, bem como, estimulando a resposta imune específica e não específica contra possíveis patógenos (Wendling & Weschenfelder, 2013; Parker *et al.*, 2018).

Dentre alguns critérios que uma bactéria precisa obedecer para ser considerada probiótica, está a sua capacidade de sobreviver ao processo digestivo, apresentando estabilidade ao ácido da bile, e de promover efeitos funcionais e benéficos à saúde do hospedeiro (Balciunas *et al.*, 2013; Silva, 2015; ANVISA, 2021). A capacidade de produzir substâncias antimicrobianas com ação bactericida ou bacteriostática, tais como bacteriocinas, é uma propriedade desejável de uma cepa

probiótica, pois pode proporcionar uma vantagem na competição e colonização do trato gastrointestinal (Martinez *et al.*, 2013).

As bacteriocinas são pequenos peptídeos termoestáveis que possuem ação antimicrobiana frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo consideradas um mecanismo importante pelo qual os probióticos podem combater cepas consideradas patogênicas (Cotter *et al.*, 2005; Wohlgemuth *et al.*, 2010). Estas biomoléculas são classificadas em quatro classes, levando em conta as suas estruturas químicas, massa molar, sensibilidade à ação enzimática e conteúdo de aminoácidos modificados. Em contraste aos antibióticos, as bacteriocinas são consideradas compostos naturais, podendo ser utilizados como bioconservantes de alimentos. As bacteriocinas mais promissoras são aquelas produzidas por bactérias ácido lácticas, pois a maior parte dessas culturas são consideradas seguras do ponto de vista alimentar (Mossallam *et al.*, 2014).

A nisina é, atualmente, a única bacteriocina aprovada para uso em alimentos, sendo considerada segura pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura e Organização Mundial da Saúde desde 1969 (Balciunas *et al.*, 2013). É amplamente empregada na indústria alimentícia em queijos, ovos, molhos, enlatados, apresentando atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e outros micro-organismos patogênicos. Atua, principalmente, através da interferência na parede celular, promovendo a formação de poros, afetando a permeabilidade da membrana celular e causando a morte bacteriana (Breukink *et al.*, 1999; Balciunas *et al.*, 2013).

Em sua maioria, os probióticos fazem parte do grupo de bactérias ácido lácticas que, por sua vez, correspondem a micro-organismos mesófilos, gram-positivos, que apresentam tolerância a acidez, capazes de converter a lactose em ácido láctico, podendo ser aeróbias, microaerófilas, anaeróbias facultativas ou anaeróbias (Lima, 2017). Os gêneros de maior destaque dentre os probióticos são *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, pois são os mais utilizados em como suplementações probióticas em alimentos, em especial *B. bifidum* e o *L. acidophilus*, os quais habitam todo o trato gastrointestinal de um indivíduo saudável (Moroti, 2009; Meybodi & Mortazavian, 2017).

O *Lactobacillus acidophilus* é um dos micro-organismos probióticos mais empregados no desenvolvimento e elaboração de lácteos fermentados. Isso se deve, principalmente, a sua qualidade de promover uma baixa taxa de pós-acidificação desse tipo de produto durante o armazenamento refrigerado, por ser homofermentativo, produzindo exclusivamente ácido láctico durante a fermentação, além de seus reconhecidos efeitos terapêuticos, os quais constituem na melhor digestibilidade da lactose, na regularização intestinal em crianças diante de quadros de

constipação e diarreia, melhora da imunidade e a atenuação dos sintomas provenientes da síndrome do intestino irritável (Dias, 2012; Silva, 2015).

As culturas probióticas empregadas na produção de produtos lácteos devem apresentar propriedades tecnológicas desejáveis que permitam uma boa multiplicação no leite, além da capacidade de proporcionar ao produto propriedades sensoriais adequadas, como aroma e textura (Lima, 2013; Wendling & Weschenfelder, 2013). Para que possam promover os benefícios a eles associados, o consumo dos produtos probióticos deve ser frequente e este deve conter a quantidade adequada de bactérias probióticas viáveis, para que possam sobreviver ao trato gastrointestinal e desempenharem o seu papel no intestino (Ertem & Çakmakçi, 2017). A resistência as condições adversas relacionadas ao trato digestivo humano é uma característica fisiológica diferenciadora das bactérias probióticas e ácido lácticas. Sua elevada tolerância a acidez permite às bactérias probióticas maior taxa de sobrevivência, a qual pode ser avaliada por ensaios gastrointestinal *in vitro*, que simulam as condições do trato gastrointestinal humano, e *in vivo*, através de ensaios com humanos e animais (Ranadheera *et al.*, 2012; Lima, 2013).

Para que um alimento seja considerado ou possa ter alegação probiótica é necessário que ele possua uma quantidade entre 10^6 e 10^7 UFC/mL ou superior de células viáveis no momento do consumo, assim como seus benefícios a saúde, ou seu efeito probiótico, serem comprovados e reconhecidos (Ozcan *et al.*, 2016; ANVISA, 2018). Por esse motivo, os grandes desafios tecnológicos da produção industrial de alimentos probióticos é garantir a viabilidade e a estabilidade das culturas probióticas nos produtos até o último dia de sua vida de prateleira e atestarem seus possíveis benefícios a saúde.

Triptofano

O triptofano é um aminoácido essencial ao organismo humano, responsável por auxiliar no crescimento, na síntese proteica e, principalmente, na síntese do neurotransmissor Serotonina. Embora esteja presente em quantidade limitada em vegetais e proteínas animais, estes são as melhores fontes de triptofano para a dieta humana, tendo carne, leite, ovos, peixes, frutos do mar, soja, cereais, chocolate, nozes e brócolis, como exemplos de alimentos com teor relativamente alto desse aminoácido (Carvalho-Santos *et al.*, 2010; Zenello, 2012).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor de grande importância que atua no sistema nervoso central, regulando os fatores adaptativos essenciais relacionados a alteração de ambiente que refletem no comportamento, como humor, ansiedade, impulsividade, agressividade, libido e compulsões alimentares (Feijó *et al.*, 2010; Palego *et al.*, 2016). Adicionalmente, a serotonina também é responsável pela modulação de atividades metabólicas como as funções intestinais, motilidade gastrointestinais, respostas imunes e

inflamatórias, regulação hidroeletrólítica, regulação da sede e do apetite, influenciando diretamente na ingestão alimentar (Martins, 2012; Palego *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2018).

A manutenção metabólica do organismo humano associada a serotonina é resultante de seu efeito inibidor da conduta aliado a modulação da atividade psíquica, que permite a serotonina estimular ou inibir o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, e assim influenciar quase todas as funções cerebrais (Feijó *et al.*, 2010; Rosa, 2016). Níveis normais de serotonina, torna possível alcançar a saciedade mais rapidamente e controlar melhor a ingestão de açúcares. Ao mesmo tempo, níveis elevados de triptofano e, conseqüentemente, serotonina, aumentam a glicemia e a quantidade de glicose liberada no cérebro, causando a redução no apetite e diminuindo o desejo por doces (Zenello, 2012; Palego *et al.*, 2016).

A disponibilidade de serotonina no organismo humano em quantidade suficiente para desempenhar o seu papel é dependente da ingestão de triptofano através da alimentação. Logo, a deficiência de triptofano na dieta de um indivíduo pode provocar diminuição dos índices de serotonina circulante e, com isso, levar ao desenvolvimento de psicopatologias como depressão, estresse, ansiedade, insônia e desordens alimentares (Zappellini, 2002; Zenello, 2012). A ingestão diária recomendada para o triptofano é de 3,5 mg/kg corporal/dia, o que faz necessário o consumo de aproximadamente 250 mg por dia desse aminoácido por um adulto de 70 kg (WHO, 2007).

Para a conversão em serotonina, é necessário que haja um equilíbrio na concentração plasmática entre o triptofano e outros aminoácidos neutros (L-Fenilalanina, L-Tirosina, L-Valina, L-Leucina e L-Isoleucina). No entanto, a quantidade de triptofano total é reduzida em até 90% cerca de 6 horas após a ingestão desses aminoácidos, resultando em apenas uma pequena parte do triptofano obtido pela dieta conseguindo chegar ao cérebro. A suplementação de triptofano pode contribuir com seu aumento no plasma, reestabelecendo o equilíbrio frente aos outros aminoácidos neutros e melhorando os níveis de serotonina no organismo humano (HOOD *et al.*, 2005; Zenello, 2012).

Os lácteos fermentados, como iogurtes e bebidas lácteas, são produtos com grande aceitabilidade para consumo diário, podendo serem inseridas em uma dieta equilibrada e ainda promover benefícios funcionais além da nutrição básica ao consumidor. A suplementação de triptofano em produtos lácteos poderia suprir a possível deficiência desse aminoácido na dieta humana e até propiciar potenciais benefícios.

A adição de peptídeos e aminoácidos, tais como o triptofano, podem favorecer a viabilidade de alguns micro-organismos durante a fermentação para a produção de produtos lácteos (Douglas & Sanders, 2008). Do mesmo modo, a suplementação de triptofano após a

fermentação bebidas lácteas foi estudada por Silva (2015) e se mostrou benéfica para a viabilidade da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus*, mostrando que o triptofano pode também ser favorável aos aspectos tecnológicos do produto.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em: julho de 2008. **IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 10 dez. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos. Guia nº 21/2021 – versão 2. Atualizado em: maio de 2021. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301#page=16&zoom=100,73,330>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

AHMAD, S.; ANJUM, F. M.; HUMA, N.; SAMEEN, A.; ZAHOOR, T. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, mineral, enzymes and vitamins. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, p.62-74, 2013.

ALMEIDA, C.C.; CONTE JÚNIOR, C.A.; SILVA, A.C.O.; ALVARES, T.S. proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16, 2013.

ALVES, M.P.; MOREIRA, R.O.; RODRIGUES JÚNIOR, P.H.; MARTINS, M.C.F.; PERRONE, I.T.; CARVALHO, A.F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.

ANDRADE, K. D. **Qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) suplementada com selênio**. Macaíba, 2015. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produção Animal – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v.32, p.134-142, 2013.

BERNARDES, O. Búfalas leiteiras - uma opção pecuária relevante. Associação Brasileira De Criadores De Búfalos. **Milkpoint**, 29 de outubro de 2019. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/associacao-brasileira-de-criadores-de-bufalos/bufalas-leiteiras-uma-opcao-pecuaria-relevante-216659/>>. Acesso em: 09 de abril de 2020.

BRASIL, R.B.; NICOLAU, E.S.; CABRAL, J.F.; SILVA, M.A.P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, p. 71-80, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa n.16, 23 de agosto de 2005**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas.

BRASIL. 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**” constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents /10181/2718376/RDC_02_2002](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002)>. Acesso em: 10 dez. 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Aprova os “**Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos**” constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BREUKINK, E.; WIEDEMANN, I.; VAN KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; SAHL, H. G.; KRUIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, v. 286, p. 2361-2364. 1999.

BRIOSCHI, E.F.C.; BRIOSCHI, M.L.; YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J. Nutrição funcional no paciente com dor crônica. **Revista Dor**, v.10, n.3, p.276-285, 2009.

CALDEIRA, L.; FERRAO, S.; FERNANDES, S.; MAGNAVITA, A.; SANTOS, T. Development of strawberry-flavored milk drink using different yoghurt levels and whey obtained from buffalo's milk. **Ciência Rural**, 40, n.10, p.2193-2198, 2010.

CARVALHO-SANTOS, J.; QUEIRÓS-SANTOS, A.; MORAIS, G.L.; SANTANA, L.H.S.; BRITO, M.G.; ARAÚJO, R.C.S.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; DEIRÓ, T.C.B.J.; BARRETO-MEDEIROS, J.M. Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 503-511, 2010.

COELHO, A.S. **Cenário da bubalinocultura no brasil**. Belém, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural da Amazônia.

COSTA, A.V.S.; NICOLAU, E.S.; TORRES, M.C.L.; FERNANDES, P.R.; ROSA, S.I.R.; NASCIMENTO, R.C. Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.1, p.209-226, 2013.

COSTA, V.M.; MONTEIRO, B.M.; MENDONÇA, A.A.N.; MELO, W.O.; VIANA, R.B. Minireview: Bubalinocultura leiteira. **Lives**, v. 3, 2017.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity. **food. Nat. Rev. Microbiol**, v.3, p.777–788, 2005.

DIAS, M.L.L.A. **Bebida fermentada simbiótica: características físico-químicas, sensoriais e viabilidade de *Lactobacillus acidophilus***. Recife, 2012. 73p. Dissertação de Mestrado - Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

DOUGLAS, L.; SANDERS, M. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v.108, n.3, p.510-521, 2008.

ERTEM, H.; ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and Gobdin. **International Journal of Food Science and Technology**, 53, 776–783, 2017.

ERTEM, H.; AND ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and Gobdin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 776–783, 2017.

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: FAO/WHO, 2002.

FEIJÓ, F.M.; BERTOLUCI, M.C.; REIS, C. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, p. 74-77, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Faostat – Statistics Database**, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acessado em: 28 de maio de 2020.

GUIMARÃES, D. H. P.; SILVA, F. R. S. R.; LÊNTHOLA, N. M. Yogurt produced with buffalo milk flavoured with cheese and guava jelly. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.18, n. 1, p. 57-61, 2015.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B., MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 11, 506 – 514, 2014.

HOOD, S.D.; BELL, C.J.; NUTT, D.J. Acute tryptophan depletion. Part I: rationale and methodology. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 39, p. 558-564, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária**. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2017. Disponível em:<<http://www.biblioteca.ibge.gov.br>>. Acesso em: 06 de abril de 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal Pesquisa da Pecuária Municipal, 2012.

JORGE, A. M.; COUTO, A. G.; CRUDEL, G. A.; PAT ÑO, E.M. **Produção de búfalas de leite**. Botucatu: FEPAF, p. 181, 2011.

KUBOTA, M; ISHIKAWA, C.; SUGIYAMA, Y.; FUKUMOTO, S.; MIYAGI, T.; KUMAZAWA, S. Anthocyanins from fruits of *Rubus croce acanthus* and *Rubus sieboldii*, wild berry from Okinawa, Japan. **Journal of Food Compositions and Analysis**, San Diego, v.28, p.179-182, 2012.

LIMA, B.F. **Viabilidade de probióticos em leites fermentados comerciais e sua resistência após exposição às condições ácidas**. Cuiabá, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – Nutrição – Universidade Federal de Mato Grosso.

- LIMA, T. C. C.; RANGEL, A. H. N.; MACÊDO, C. S.; ARAÚJO, T. P. M.; ARAÚJO, V. M.; LIMA JÚNIOR, D. M.; MURMANN, L.; NOVAES, L. P. Composição e qualidade do leite e do soro do leite de búfalas no estado do Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.1, p.25-30, 2014.
- LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D., VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, p.33-37, 2009.
- MARQUES, A. P. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro lácteo e café solúvel com atividade probiótica**. Lavras, 2012. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras.
- MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.; OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by Bifidobacterium spp. A review. **Biotechnology Advances**, v.31, p.482–488, 2013.
- MARTINS, A.C.C.L. **Determinação de precursores da serotonina - triptofano e 5-hidroxitriptofano - em café por CLAE-PAR iônico**. Belo Horizonte, 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - Faculdade Federal de Minas Gerais.
- MATHIAS, T.R.S.; ANDRADE, K.C.S.; ROSA, C.L.S.; SILVA, B.A. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p.12-20, 2013.
- MEYBODI, N. M.; MORTAZAVIAN, A. M. Probiotic Supplements and Food Products: A Comparative Approach. **Biochem Pharmacol**, v.6, n.2, p. 227, 2017.
- MOROTI, C.; MAGRI, L.F.S.; SOUZA, J.C.B.; MATOS, D.B.S.; COSTA, M.R.; SIVIERI, K. Potencial da utilização de alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos na redução de colesterol sanguíneo e glicemia. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11, n.4, p.63-67, 2009.
- MOSSALLAM, S. F.; AMER, E. I.; DIAB, R. G. Potentiated anti-microsporidial activity of *Lactobacillus acidophilus* CH1 bacteriocin using gold nanoparticles. **Experimental Parasitology**, v.144, p.14–21, 2014.
- OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- OZCAN, O.; OZCAN, T.; YILMAZ-ERSAN, L.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; DELIKANLI, B. The use of prebiotics of plant origin in functional milk products. **Food Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 15-22, 2016.
- PALEGO, L.; BETTI, L.; ROSSI, A.; GIANNACCINI, G. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. **Journal of Amino Acids**, 2016.
- PARKER, E. A.; ROY, T.; D'ADAMO, C. R.; WIELAND, L. S. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, p. 125 – 134, 2018.

- PECOVÁ, L.; SAMKOVÁ, E.; HANUŠ, O.; HASO NOVÁ, L.; ŠPIČKA, J. Fatty acids stability in goat yoghurt. **Ciência Rural**, v.49, 2019.
- PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e de vaca. **Revista Caatinga**, v.27, p.226-233, 2014.
- PITACAS, F.I.; RODRIGUES, A.M. Produção de búfalos de leite na Europa. Divulgação Técnica. **Agroforum**, n. 31, v. 21, 2013.
- QUINATO, E.E.; DEGÁSPARI, C. H.; VILELA, R. M. Aspectos Nutricionais e Funcionais do Morango. **Visão Acadêmica**, v.8, n.1, 2007.
- RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; REIS FILHO, A.D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**, v.4, n.2, p.66-74, 2011.
- RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619 – 625, 2012.
- ROCHA, L. A. C. **Qualidade do leite de búfala e desenvolvimento de bebida láctea com diferentes níveis de iogurte e soro de queijo**. Itapetinga, Bahia, 2008. Dissertação de Mestrado – Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- ROHLFES, A. L. B.; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M. S. R.; MARQUARDT, L.; RICHARDS, N. S. P. S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-lógica**, v.15, n.2, p.79-83, 2011.
- ROSA, P.B. **Efeitos tipo-antidepressivos do ácido ascórbico e da cetamina envolvem a modulação de receptores GABAérgicos**. Florianópolis, 2016. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Bioquímica – Universidade Federal de Santa Catarina.
- SERRA, A.T.; DUARTE, R.O.; BRONZE, M.R.; DUARTE, C.M.M. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. **Food Chemistry**, Barking, v.125, n.2, p.318-325, 2011.
- SILVA, T. M. S. **Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado**. São Paulo, 2015. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- SIMEONI, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.M.; MENEZES, F.C.; STEFANELLO, F.S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, p. 66-75, 2014.
- SIMÕES, M.G. **Efeitos de variações sazonais e da proporção leite de vaca: leite de búfala sobre características físico-químicas e microbiológicas de queijos artesanais do Marajó**. Viçosa, 2014. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa.

SIQUEIRA, A.M.O.; MACHADO, E.C.L. STAMFORD, T.L.M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.9, p.1693-1700, 2013.

SOUZA, F.S.; COCCO, R.R.; SARNI, R.O.S.; MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamentos de doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.1, p.86-97, 2010.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

WENDLING, L.K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados – uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

WOHLGEMUTH, S., LOH, G., BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.300, p.3–10, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. Geneva, p. 265, 2007.

ZANELLO, D.R.P. **Efeitos do l-triptofano sobre ansiedade, compulsão e escolha alimentar**. Brasília, 2012. Trabalho de Conclusão de Curso – Nutrição – Centro Universitário De Brasília, Faculdade De Ciências Da Educação E Saúde.

ZAPPELLINI, E.M.S. **Aspectos relevantes para formação do estudante de nutrição: a diretoria na neurotransmissão**. Florianópolis, 2002. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção – Universidade Federal de Santa Catarina.

• **CAPÍTULO** •

2

Efeito da matriz láctea e do teor de soro na elaboração de bebidas lácteas probióticas produzidas a partir de leite bubalino e bovino

SILVA, T. M. S.; PIAZENTIN, A. C. M.; MENDONÇA, C. M. N.; CONVERTI, A.; BOGSAN, C. S. B.; MORA, D.; OLIVEIRA, R. P. S. Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, n. 9, 2020.

RESUMO

O soro de leite é um subproduto da indústria queijeira capaz de gerar um alto impacto ambiental quando descartado indevidamente. O aproveitamento do soro no preparo de bebidas lácteas, além de enriquecer sua nutrição, melhora seu custo-benefício. O leite de búfala apresenta excelente perfil nutricional, fazendo com que o seu uso na elaboração de bebidas lácteas, juntamente com o soro de leite bubalino, seja uma alternativa interessante do ponto de vista nutricional, tecnológico e ambiental. Em vista disso, bebidas lácteas probióticas, fermentadas por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, foram elaboradas a partir de leite de búfala e leite de vaca com diferentes níveis de soro de leite (0, 25 e 50%) e avaliadas quanto a cinética de acidificação, perfil de desenvolvimento das culturas lácticas ao longo da fermentação, teores de proteína, gordura e extrato seco não gorduroso, perfil de pós acidificação, viabilidade das bactérias utilizadas ao longo da vida de prateleira e resistências ao estresse gastrointestinal *in vitro* ao final de 21 dias de armazenamento refrigerado. Os parâmetros cinéticos não apresentaram diferenças significativas entres a fermentação no leite bubalino e bovino. Os teores de gordura, proteína e extrato seco desengordurado foram menores nos produtos contendo soro em sua composição, principalmente nas bebidas lácteas bovinas. O pH dos produtos lácteos diminuiu gradativamente durante o armazenamento, mas foi menos expressiva nos produtos contendo soro de leite. As bactérias utilizadas apresentaram população entre cerca de 10^6 e 10^9 UFC/mL ao final do armazenamento refrigerado e foram encontradas em maiores quantidades nos produtos lácteos elaborados a partir do leite de búfala, mostrando variação de 7,33 e 8,83 logs UFC/mL nesses produtos. A bebida láctea bovina com 50% de soro (LV3) não exibiu células viáveis ao final da simulação do estresse gastrointestinal *in vitro* enquanto, por sua vez, os produtos lácteos bubalinos mostraram boa viabilidade das culturas lácticas durante toda a análise, demonstrando um efeito protetivo benéfico às bactérias.

Palavras-chave: bebidas lácteas, leite de búfala, probiótico, viabilidade, estresse gastrointestinal

1. INTRODUÇÃO

Dentro do atual e crescente mercado de produtos funcionais, os derivados lácteos probióticos, como as bebidas lácteas, ganham cada vez mais espaço por apresentarem grande atratividade ao consumo, ótima aceitabilidade e a possibilidade de serem inseridos em uma dieta equilibrada (Mathias *et al.* 2013, Silva, 2015). As bebidas lácteas são caracterizadas como produto elaborados com base na mistura de leite e soro de leite, podendo ou não ser fermentada (Brasil, 2005a).

O uso do soro de leite para a produção de bebidas lácteas, além de contribuir para o valor nutricional e custo/benefício do produto, é uma alternativa de reaproveitamento de um subproduto da indústria queijeira (Costa *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2013). Para muitas indústrias queijeiras, o soro de leite gera um custo adicional com o tratamento de efluentes de baixa eficiência ou representa um desperdício nutricional ao ser destinado a alimentação de suínos. O descarte inadequado no meio ambiente é altamente prejudicial, uma vez que, devido a quantidade de matéria orgânica, o soro apresenta um alto poder poluente (Rocha, 2008; Rohlfes *et al.*, 2011).

O uso do leite de búfala para o preparo de derivados lácteos é relacionado a um produto de maior qualidade e rendimento, uma vez que apresenta características nutricionais que se sobressaem ao leite bovino, como os teores de gordura, proteína, lactose e alguns minerais (cálcio, ferro, magnésio e fósforo), além de apresentar teores menores de colesterol (Ahmad *et al.*, 2013; Pignata *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2015). O aproveitamento do soro de leite bubalino para o desenvolvimento de bebidas lácteas probióticas confere maior valor nutricional ao produto, além de valorizar o conceito de produzir um alimento lácteo funcional de alto valor agregado aliado ao aspecto ambiental, uma vez que a maior parte da produção da bubalinocultura leiteira no Brasil, é destinada a indústria queijeira. Em particular, além de contribuir de forma benéfica ao ambiente, o soro de leite agrega ao produto fermentado qualidade nutricional e tecnológica desejável (Costa *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2013).

As bebidas lácteas probióticas possuem em sua composição “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.* 2014). Os potenciais benefícios atribuídos ao consumo de probióticos estão associados a manutenção da saúde e a prevenção de doenças, atuando na melhora da imunidade e no equilíbrio da microbiota (Ertem & Çakmakçi, 2018; Parker *et al.*, 2018). Esses benefícios são diretamente relacionados a frequência de consumo dos probióticos e sua concentração adequada nos produtos (Ertem & Çakmakçi, 2018). A concentração do probiótico no alimento pode ser comprometida por diferentes fatores relacionados a matriz alimentar, como sua composição e acidez, bem como interações entre o probiótico e a cultura starter (Misrha & Misrha, 2013; Casarotti & Penna, 2015).

Em vista disso, este trabalho se objetivou em avaliar bebidas lácteas probióticas elaboradas a partir de leite bubalino e bovino com diferentes proporções de soro quanto aos parâmetros cinéticos, químicos, perfil de pós acidificação, viabilidade das culturas fermentadoras e sua resistência ao estresse gastrointestinal *in vitro* ao longo do armazenamento refrigerado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

As bebidas lácteas foram formuladas a partir de leite e soro bubalinos e bovinos, com adição de culturas lácticas.

O leite bubalino pasteurizado foi fornecido pela Fazenda Montenegro (Sorocaba, São Paulo, Brasil), proveniente de búfalas da raça Murrah. O leite bovino pasteurizado (Fazenda Bela Vista, Tapiratiba, São Paulo, Brasil) foi obtido de lojas de varejo.

Os soros de leite, tanto búfala quanto de vaca, foram obtidos do preparo artesanal de queijos do tipo Minas Frescal a partir dos mesmos leites utilizados na elaboração das bebidas lácteas.

As culturas lácticas utilizadas foram: *Streptococcus thermophilus* TA040 (DuPont, França), *Lactobacillus bulgaricus* LB340 (DuPont, França) e *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen, Dinamarca).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo da matriz fermentada

2.2.1.1. Preparo da base láctea

Ambos os leites, bubalino e bovino, passaram por um tratamento térmico no equipamento Thermomix (Vorwek & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha) por 5 minutos a temperatura de 90°C, sob agitação de 40 rpm. Em seguida, os leites foram transferidos para frascos estéreis do tipo Schott e resfriados em banho de gelo até atingir a temperatura de 10°C. Por fim, o leite foram armazenados a 4°C por 24 horas antes de serem utilizados.

Todo o procedimento foi realizado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP.

2.2.1.2. Preparação do inóculo para as culturas lácteas *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb) e *L. acidophilus* (La)

As culturas lácteas *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* foram adicionadas, separadamente, em tubos Falcon contendo caldo MRS (Difco, Le Pont de Claix, França), enquanto *S. thermophilus* foi adicionado em tubo Falcon contendo caldo M17 (Difco, Le Pont de Claix, França). Os tubos foram mantidos a 37°C por 24 horas de onde, posteriormente, foram retiradas alíquotas destes e transferidas para novos tubos com MRS e M17. Após 24 horas, tendo permanecido também a 37°C, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram lavados com solução salina (0,85%) estéril e novamente centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. Essa etapa de lavagem foi repetida em um total de três vezes. Para a inoculação das bactérias nas matrizes lácteas, o precipitado foi ressuspendido em leite estéril e, a partir desse inóculo, foram retiradas alíquotas para serem adicionadas aos frascos Schott contendo o leite a ser fermentado, possibilitando uma população inicial de ~5.0 logUFC/mL.

2.2.1.3. Cinética de fermentação

Primeiramente, os frascos do tipo Schott contendo 500 mL das matrizes lácteas foram inoculados com as culturas lácteas conforme descrito no item 3.2.1.2. A seguir, os frascos foram colocados em banho-maria pré-aquecido a 42°C e acoplados ao sistema CINAC - *Cinétique d'acidification* (Ysebaert, Frépillon, França), onde a fermentação foi monitorada até atingir o pH de 4,7. O sistema CINAC possibilita a medição contínua do pH durante toda a fermentação, bem como a gravação dos dados e cálculo da taxa de acidificação. Ao final da fermentação, quando o pH desejado de 4,7 foi atingido, esta foi interrompida e os frascos foram colocados em banho de gelo por 10 minutos. A seguir, realizou-se a quebra do coágulo do produto fermentado utilizando um bastão de aço inoxidável esterilizado contendo um disco perfurado, com movimentos verticais durante 60 segundos (Silva, 2015).

Os dados obtidos através do sistema CINAC permitiram calcular parâmetros cinéticos de acidificação, como a velocidade máxima de acidificação (V_{\max}), o tempo no qual se atinge a velocidade máxima (t_{\max}), o pH em que o leite estava quando essa velocidade máxima de acidificação foi atingida ($pH_{v\max}$), o tempo necessário para o leite atingir o pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e o tempo necessário para concluir a fermentação e atingir o pH 4,7 ($t_{pH4,7}$).

2.2.1.4. Curva de desenvolvimento microbiano

Para a curva de desenvolvimento das culturas lácticas ao longo da fermentação, alíquotas dos leites foram retiradas a partir do tempo 0 (T0), correspondente aos leites antes da fermentação, e então a cada hora de fermentação (T1, T2, T3 e T4) totalizada em, aproximadamente, 4 horas.

Para a enumeração das bactérias *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, seguiu o procedimento descrito no item 3.2.5.

2.2.2. Desenho experimental e preparação das bebidas lácteas

O delineamento experimental proposto se constitui na formulação de 6 produtos que se baseiam no tipo de leite utilizado, bubalino ou bovino, e nas proporções de soro em cada produto (Tabela 1).

Para a fabricação das bebidas lácteas, os leites fermentados foram misturados ao soro de leite nas proporções pré-definidas (0, 25 e 50% de soro) utilizando o equipamento Thermomix (Vorwek & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha). Após a mistura, os produtos foram envasados manualmente em frascos plásticos esterilizados de 50 mL e armazenados a 4°C durante 21 dias. Os experimentos foram feitos em duplicata em dias diferentes de forma que sejam obtidos resultados a partir da média de fermentações independentes.

Tabela 1. Delineamento experimental tipo compósito central (CCD) para a elaboração de bebidas lácteas probióticas com polpa de morango.

Ensaio	Leite	Base láctea	
		Soro de leite %	Leite %
LB1	Búfala	0	100
LB2	Búfala	25	75
LB3	Búfala	50	50
LV1	Vaca	0	100
LV2	Vaca	25	75
LV3	Vaca	50	50

A bebidas lácteas produzidas foram analisadas quanto evolução do valor de pH e quanto a população de bactérias lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*) após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado. As análises de determinação de gordura e proteína, assim como a simulação de sobrevivência gastrointestinal *in vitro*, foram realizadas ao 7º dia de armazenamento refrigerado.

2.2.3. Determinação de gordura, extrato seco total desengordurado e proteína

2.2.3.1. Determinação de gordura pelo Método de Gerber

O método de Gerber é o mais utilizado para determinar a gordura no leite. O método se baseia na quebra da emulsão do leite, o que ocorre pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, aliado a centrifugação.

Para a análise, foram transferidos 10 mL de ácido sulfúrico em um butirômetro. Em seguida, adicionou-se 11 mL do leite lentamente, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. Por último, foi adicionado 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi tampado com uma rolha e, usando uma luva térmica, foi agitado cuidadosamente até completa dissolução. O butirômetro foi então centrifugado por 15 min a 1200 rpm e passado para um banho (65°C) durante 3 minutos com as rolhas para baixo. Ao final do procedimento, houve a separação da parte lipídica do leite que permite, através do manejo da rolha voltada para baixo, ajustar o menisco na parte graduada. O resultado já é expresso em porcentagem de gordura presente na amostra (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985).

2.2.3.2. Determinação do Extrato Seco Total Desengordurado (ESTD)

Para se determinar o extrato seco total desengordurado das matrizes lácteas, foi necessário obter o resultado do extrato seco total das amostras. Tal determinação foi realizada com o uso do método de Ackermann, onde os dados de teor de gordura e densidade de cada matriz láctea foram combinados e comparados utilizando o disco de Ackermann (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985).

A determinação do percentual do extrato seco desengordurado foi realizada através da subtração do extrato seco total da porcentagem de gordura.

$$\% \text{ Extrato seco total} - \% \text{ de Gordura} = \text{Extrato seco desengordurado}$$

2.2.3.3. Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl

Primeiramente, pesou-se 1 g de amostra em um tubo de digestão, adicionando um comprimido de catalisador de Kjeldahl (composto por 6,25% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em sulfato de potássio) e, em seguida, 20 mL de ácido sulfúrico.

Os tubos foram passados para o digestor, onde a digestão foi realizada a uma temperatura de 350 a 420°C por 2 horas, onde a amostra apresentou uma coloração verde clara translúcida.

Após esfriarem, os tubos foram colocados no destilador, tendo um Erlenmeyer com 50 mL de ácido bórico contendo fenolftaleína no final do equipamento. A destilação foi realizada adicionando hidróxido de sódio à amostra no tubo de digestão. Quando o volume no Erlenmeyer chegou a 150 mL, a destilação foi concluída. Esse volume foi titulado com ácido clorídrico 0,1N

e o valor gasto foi utilizado para calcular a percentagem de nitrogênio nas amostras (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985).

Sendo: N = Normalidade da solução de NaOH;

V1= Volume do titulante gasto na amostra (mL);

V0= volume de titulante gasto no ensaio em branco (mL);

m = massa da amostra em (g);

Com o resultado dessa equação, foi possível calcular a percentagem de proteína utilizando a equação: % Proteína = %Nitrogênio*6,38

2.2.4. Pós acidificação

O perfil de pós acidificação das bebidas lácteas foi avaliado através da medição do valores de pH durante o período de armazenamento das bebidas lácteas, o que foi determinados em potenciômetro digital (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As análises foram realizadas em triplicata e em períodos pré-determinados, a seguir: d1 (24 h); d7 (sete dias) d14 (catorze dias) e; d21 (vinte e um dias) após a fermentação.

2.2.5. Enumeração de bactérias viáveis

Para a enumeração da população as bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, amostras de 1 mL das bebidas lácteas foram adicionadas a 9 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizadas durante 1 min em um agitador de tubo. No mesmo diluente, foram feitas diluições seriadas e a inoculação destas em meios seletivos. O meio de cultura ágar M17 (Difco, Le Pont de Claix, França) foi utilizado para enumerar a bactéria *S. thermophilus* enquanto a enumeração de *L. bulgaricus* foi realizada ágar MRS (Difco, Le Pont de Claix, França) com o pH ajustado para 5,4, tendo ambas bactérias tendo sido incubadas a 37°C por 72 horas. Os meios citados foram preparados de acordo com recomendações de Saccaro *et al.* (2011). O *L. acidophilus* foi enumerado em meio modificado ágar MRS adicionado de solução de maltose 50% e após incubação a 37°C por 72h em jarra de anaerobiose de acordo com a metodologia descrita por Dave e Shah (1996) e Saccaro *et al.* (2011). As condições de anaerobiose foram estabelecidas usando-se AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke). Placas contendo de 30 a 300 colônias selecionadas para serem enumeradas e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL de produto (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata e em períodos pré-determinados, a seguir: d1 (24 h); d7 (sete dias) d14 (catorze dias) e; d21 (vinte e um dias) após a fermentação.

2.2.6. Avaliação do estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático

A resistência ao estresse gastrointestinal *in vitro* das bactérias lácticas, mostrando sua capacidade de sobrevivência ao processo digestivo, foi avaliada nas bebidas lácteas no sétimo dia de armazenamento refrigerado através modelo de digestão estática adaptado de Bedani *et al*, (2013). Esse modelo é dividido em três fases: (i) gástrica (estômago), (ii) primeira fase entérica (intestino delgado) e (iii) segunda fase entérica (intestino grosso). A análise possui uma duração total de 6 horas, sendo que cada fase apresenta a duração de 2 horas. Ao final de cada fase, alíquotas das amostras foram retiradas para a enumeração das bactérias viáveis, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.5.

Para a análise, primeiramente foi feita a diluição de 25 mL de amostra de bebida láctea em 225 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Desta diluição inicial, retirou-se 10 mL e transferiu-se para um frasco tipo Schott de 100 mL.

Na fase gástrica (i), o pH das amostras foi ajustado para certa de 2,4 – 2,7 utilizando HCl 1N. Foram, então, adicionadas soluções de pepsina (Pepsina, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) e lipase (Amano lipase G, from *Penicilium camemberti*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) em concentrações de 3,0 g/L e 0,9 mg/L respectivamente. Em seguida, os frascos foram incubados em banho metabólico (Maxi-Shake, Heto, Brasil) a 37°C em agitação de 150 rpm durante 2 horas. Na primeira fase entérica (ii) o pH foi aumentado para 6,0 – 6,3 utilizando de uma solução de 1N de NaOH em tampão fosfato. Posteriormente, foram adicionadas soluções de 10 g/L de bile (Bile extract, porcine, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) e 1 g/L de pancreatina (Pancreatina 3 NF, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil), antes dos frascos novamente serem incubados em banho a 37°C – 150 rpm por 2 horas. Na segunda fase entérica (iii) o pH foi ajustado para 7,2 – 7,4 utilizando solução de 1N de NaOH da primeira fase, assim como a solução de bile e pancreatina, para que as mesmas se mantivessem nas concentrações de 10 e 1 g/L. Por fim, os frascos voltaram a ser incubados a 37°C – 150 rpm durante 2 horas.

3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O tratamento dos dados foi realizado através de análise de variância multifatorial (ANOVA) e testes de comparação de média utilizando o programa Minitab 17.0 a fim de determinar a significância estatística da diferença entre as médias. As médias serão comparadas através do teste de Tukey usando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processo fermentativo

4.1.1. Cinética de acidificação

A fermentação foi realizada a partir da combinação das culturas iniciadoras (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) com o probiótico *L. acidophilus* tanto no leite bubalino quanto no bovino. Os parâmetros da cinética de fermentação estão descritos na Tabela 3 enquanto a curva de acidificação, que mostra o comportamento das culturas utilizadas nos leites, é apresentada na Figura 1.

O tempo necessário para a fermentação alcançar o pH desejado (4,7) foi de $4,67 \pm 0,04$ horas para o leite bubalino e de $3,87 \pm 0,06$ horas para o leite bovino. Embora a fermentação do leite de búfala tenha levado 52 minutos a mais para ser concluída, os resultados não apresentaram diferença significativa entre si ($P \geq 0,05$). Kristo et al. (2003), em seu estudo sobre o processo de acidificação de leites fermentados, indicou que a quantidade de sólidos totais no leite pode influenciar o tempo e fermentação. Segundo os autores, leites com maiores teores de sólidos totais apresentariam maior capacidade tamponante, resultando em uma acidificação mais lenta.

O tempo de fermentação relatado por Medeiros et al. (2010), ao avaliar o efeito de tratamentos térmicos e da temperatura na acidificação de diferentes tipos de leites fermentados com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, são superiores ao presente estudo, chegando a 9 horas nas fermentações mais longas de leite bovino e bubalino. Isso mostra que a presença do *L. acidophilus* pode ter influenciado a fermentação, contribuindo para uma acidificação mais rápida. Bezerra (2010) observou uma duração de cerca de 4,5 horas da fermentação em leite caprino e bubalino, resultado próximo ao que obtivemos no atual estudo para o leite bubalino.

Tabela 3. Parâmetros da cinética do processo fermentativo *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (La5) em leite bubalino e bovino a 42°C até pH 4,7.

Matriz Látea	pH Inicial	TpH5,5 (h)	TpH5,0 (h)	TpH4,7 (h)	Vmax (upH.min-1)	Tvmax (h)	pHVmax
Leite de búfala	$6,65 \pm 0,01^a$	$2,87 \pm 0,12^a$	$3,60 \pm 0,04^a$	$4,67 \pm 0,04^a$	$17,45 \pm 0,014^a$	$2,80 \pm 0,00^a$	$5,57 \pm 0,00^a$
Leite de vaca	$6,57 \pm 0,02^a$	$2,73 \pm 0,10^a$	$3,80 \pm 0,02^a$	$3,87 \pm 0,06^a$	$16,68 \pm 0,012^a$	$2,80 \pm 0,00^a$	$5,41 \pm 0,00^a$

N=4. Onde: Vmax (velocidade máxima de acidificação), Tvmax (tempo em que a velocidade máxima de acidificação foi atingida) e pHVmax (pH em que a velocidade máxima de acidificação foi atingida). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas. $P \leq 0,05$.

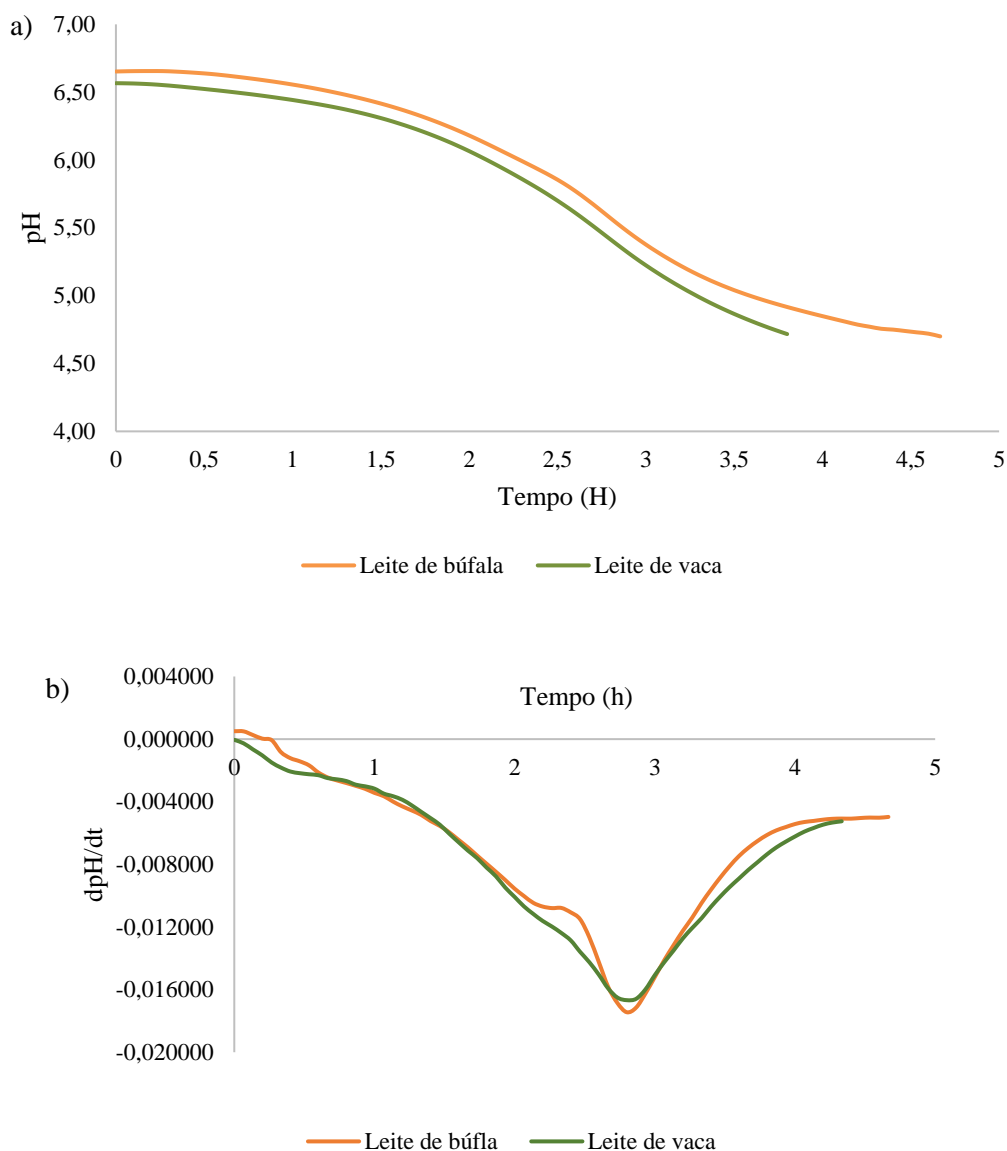


Figura 1. Curva de acidificação da fermentação por *Streptococcus thermophilus* (TA040), *Lactobacillus bulgaricus* (LB340) e *Lactobacillus acidophilus* (La5) em leite bubalino e bovino a 42°C até pH 4,7. Onde: a) valores de pH; b) dpH/dt com os valores de velocidade de acidificação.

O tempo necessário para a fermentação atingir o pH 5,5 e 5,0 correspondem ao início da formação do gel, onde as micelas de caseína se desintegram e iniciam uma nova estrutura. Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os leites com relação ao tempo necessário para atingir tais valores de pH.

O parâmetro para V_{max} indica a velocidade máxima durante a acidificação, com a diminuição mais expressiva do pH, e, da mesma forma, o parâmetro T_{vmax} representa o tempo em que essa velocidade foi atingida. A fermentação do leite de búfala atingiu o V_{max} de 17,45 upH.min⁻¹ em um T_{vmax} de 2,80 horas. Embora tenha apresentado o mesmo T_{vmax} de 2,80 horas, a fermentação

no leite de vaca atingiu um valor de V_{max} menor, sendo este de 16.68 upH.min⁻¹, porém sem diferença significativa entre os leites ($P \geq 0,05$). Os resultados obtidos quanto ao parâmetro pH_{max}, que indica o pH em que a velocidade máxima de acidificação foi atingida, foi aproximada entre os leites e também não foi significativamente diferente ($P \geq 0,05$), tendo o leite de búfala apresentado um pH_{max} de 5,57 enquanto o leite de vaca 5,41.

Tais resultados mostram que o tipo de leite não interferiu de forma significativa no comportamento fermentativo das bactérias, que apresentaram a mesma eficiência na fermentação em ambos os tipos de leite. Casarotti e Penna (2015) relataram valores semelhantes nos parâmetros cinéticos da fermentação de diferentes bases lácteas com adição de farinhas de frutas por *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, porém um tempo menor de fermentação, 4.39 horas para que o controle chegasse ao pH 4.6.

4.1.2. Curva de desenvolvimento das culturas fermentativas

As curvas do desenvolvimento das culturas lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) durante a fermentação dos leites bubalino e bovino é exibida na Figura 2. Tanto a cultura iniciadora quanto o probiótico utilizado, apresentaram crescimento entre 3,10 e 3,78 log UFC/mL ao longo do tempo de fermentação para *L. acidophilus* e *S. thermophilus* em leite de vaca e búfala, respectivamente.

O *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* mantém uma relação simbiótica durante a fermentação conjunta, onde pH inicial do leite favorece o crescimento do *S. thermophilus* que, através da acidificação do leite pelo consumo de lactose e produção de ácido láctico, torna o meio mais ácido e favorável para o desenvolvimento do *L. bulgaricus* (Reis, 2013) e, por sua vez, do *L. acidophilus*. Parte desse comportamento pode ser observado nas curvas de desenvolvimento do *S. thermophilus* que, no intervalo entre T0 e T1, correspondente a primeira hora de fermentação, apresentou crescimento de 1,73 log UFC/mL no leite bovino e 1,60 log UFC/mL no leite bubalino. Esse crescimento foi superior ao exibido por *L. bulgaricus* (0,79 e 0,87 log UFC/mL) e *L. acidophilus* (0,67 e 0,78 log UFC/mL), respectivamente, na fermentação do leite bubalino e bovino, dentro do mesmo intervalo de análise.

Enquanto o crescimento das culturas lácticas se mostrou constante durante a fermentação do leite bovino, as mesmas bactérias mostraram maior crescimento em leite de búfala entre 2 (T2) e 3 (T3) horas de fermentação. Esse período é próximo do observado durante o estudo cinético correspondendo ao tempo em que a fermentação alcançou a velocidade máxima de acidificação. Embora tenham apresentado comportamento diferente durante a fermentação dos leites utilizados, as culturas lácticas exibiram uma população próxima ao final da fermentação. *S. thermophilus*

terminou a fermentação apresentando $8,18 \pm 0,04$ logUFC/mL no leite de búfala e $8,13 \pm 0,07$ logUFC/mL para o leite de vaca. *L. bulgaricus* mostrou uma população final de $8,04 \pm 0,07$ e $7,96 \pm 0,04$ logUFC/mL, enquanto *L. acidophilus* de $8,39 \pm 0,09$ e $8,33 \pm 0,04$ logUFC/mL, no leite bubalino e bovino, respectivamente.

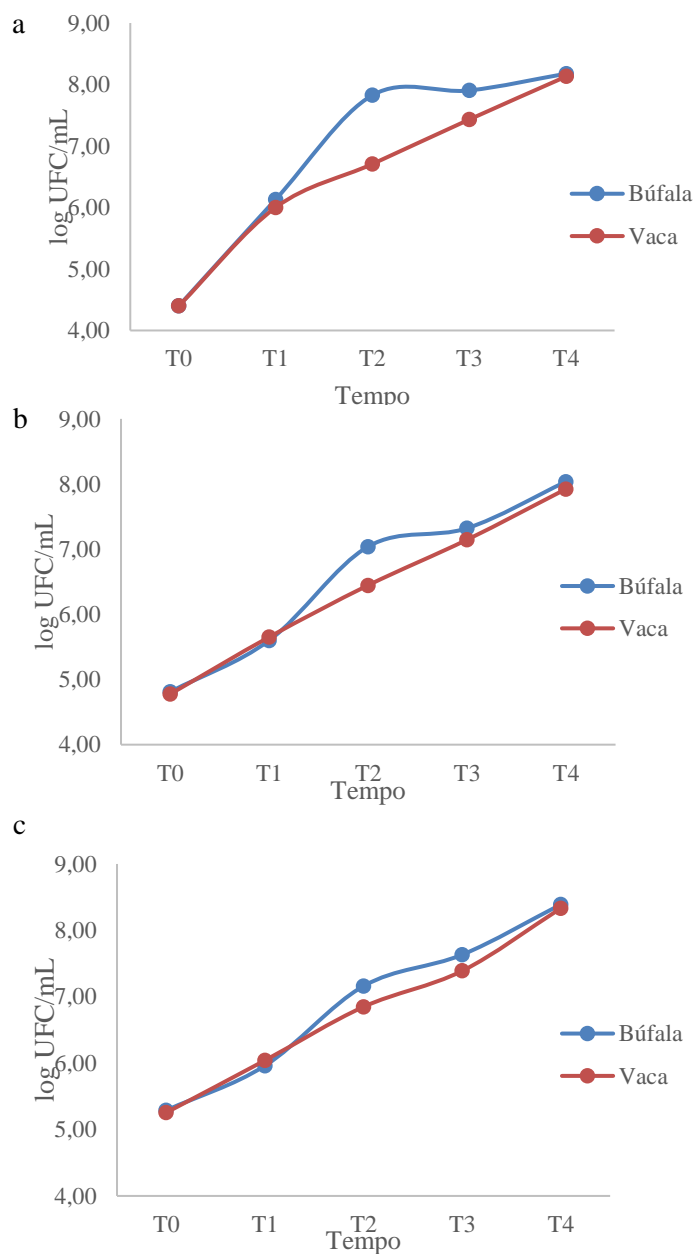


Figura 2. Curva de desenvolvimento das culturas lácticas durante a fermentação de leite bubalino e bovino a 42°C até pH 4,7. Onde: a) *Streptococcus thermophilus*; b) *Lactobacillus bulgaricus*; c) *Lactobacillus acidophilus*.

4.2. Determinação de gordura, proteína e extrato seco desengordurado

Os resultados obtidos quanto a determinação de gordura e proteína estão apresentados na Tabela 3. Os leites utilizados para o preparo das bebidas lácteas apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) quanto ao teor de gordura, sendo a gordura presente no leite de búfala (5,15 g/100g) cerca de 58% superior do que a encontrada no leite de vaca (3,25 g/100g).

Assim como esperado, foi observado a diminuição dos teores de gordura nas bebidas lácteas a medida que o soro foi adicionado a sua formulação. As bebidas lácteas com 25% de soro em sua composição (LB2 e LV2) mostraram uma redução de 28 (LB2) e 21% (LV) no teor de gordura, enquanto as bebidas lácteas com 50% de soro apresentaram uma redução de 43 (LB3) e 33% (LV3). Em contrapartida, os produtos lácteos sem adição de soro de leite em suas formulações (LB1 e LV1), não apresentaram diferença significativa ($P \geq 0,05$) se comparados aos leites com os quais foram elaborados.

Em seu estudo sobre a composição nutricional do leite de búfala em diferentes épocas do ano, Amaral et al. (2005) obtiveram resultados superiores do que os encontrados no presente estudo, que variaram de 6,42 a 7,67%.

O teor de gordura apresentado pelo leite bovino se encontra abaixo, porém próximo, ao descrito por Venturoso et al. (2007), cujo leite integral convencional analisado apresentou teor de gordura entre 3,46% a 3,60%. Uma vez que no presente trabalho o leite de vaca utilizado foi adquirido no varejo e, se tratando de um leite pasteurizado comercial, pode haver a padronização do teor de gordura. Isso mostra que os teores de gordura do leite bovino utilizado na produção das bebidas lácteas se encontram próximos do leite *in natura*.

As bebidas lácteas também mostram redução no teor de proteína quando o soro de leite foi adicionado a sua formulação. A bebida láctea bovina com 50% de soro (LV3) exibiu o menor teor de proteína (2,09g/100g), com uma diferença de 27% do produto bovino sem adição de soro (LV1), ao mesmo tempo que as bebidas LB3, LV1 e LV2, não apresentaram diferença significativa ($P \geq 0,05$) com relação ao teor de proteína. Isso foi observado com relação as matrizes lácteas utilizadas na elaboração dos produtos, que apresentaram valores aproximados do teor de proteínas, sendo 3.33 g/100g para o leite bubalino e 3.21g/100g para o leite bovino.

Alguns estudos (Yadav, Jain e Sinha, 2007; Zhou et al., 2018) relataram teores mais elevados de proteína para leite bubalinos que variam de 4.54 a 4,92 g/100g. Entretanto, os valores obtidos nesse presente estudo quanto ao teor de proteína nos produtos lácteos sem adição de soro em sua formulação (LB1 e LV1) se mostram próximos dos resultados exibidos por Guimarães et al. (2014), sendo de 2,61 e 2,71 g/100g para iogurtes de vaca e búfala, respectivamente.

O teor de proteína apresentado pelo leite bovino, foi superior ao encontrado por Venturoso *et al.* (2007), que obteve os teores de 2,40 e 2,89 g/100g em suas análises. Já os teores

de proteína para o leite bubalino, novamente se encontram abaixo dos obtidos por Amaral *et al.* (2005) que foi de 3,98 g/100g.

Guimarães e Silva (2014), em seu estudo de comparação sobre a composição de iogurtes elaborados com leite bubalino e bovino, observaram teores de gordura e proteína, respectivamente, de 3,33 e 2,61 g/100g para os iogurtes bovinos e de 5,88 e 2,71 g/100g para os iogurtes bovinos. Resultados próximos ao observado no presente estudo para os produtos sem adição de soro de leite. Em uma comparação semelhante entre a composição nutricional do leite bubalino e bovino, Pignata *et al.* (2014) também apresentaram resultados próximos aos encontrados nesse atual trabalho. Sendo os teores para o leite bubalino e bovino, respectivamente, de gordura em 4,26 e 4,05 g/100g e proteína em 3,05 e 2,92 g/100g.

Tabela 3. Quantidade de gordura, proteína e sólidos totais não gordurosos das bebidas lácteas e dos leites utilizados para sua elaboração.

Bebidas lácteas/leites	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Sólidos totais não gordurosos (SNG g/100g)
LB1	5,10±0,08 ^a	4,28±0,03 ^a	13,35±0,13 ^a
LB2	3,68±0,12 ^b	3,89±0,03 ^b	10,17±0,08 ^b
LB3	2,87±0,01 ^{cd}	2,71±0,01 ^d	7,12±0,06 ^e
LV1	3,52±0,14 ^b	2,88±0,03 ^d	9,94±0,20 ^b
LV2	2,56±0,13 ^d	2,71±0,01 ^d	7,96±0,23 ^d
LV3	1,70±0,17 ^e	2,09±0,03 ^e	5,98±0,13 ^f
Leite de búfala	5,35±0,07 ^a	3,33±0,07 ^c	7,85±0,03 ^c
Leite de vaca	3,25±0,21 ^{bc}	3,21±0,11 ^c	9,25±0,04 ^d

N=3. Bebida láctea bubalina contendo 0 (LB1), 25 (LB2) e 50% (LB3) de soro em sua formulação; bebida láctea bovina contendo 0 (LV1), 25 (LV2) e 50% (LV3) de soro em sua formulação. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($P \leq 0.05$).

É uma característica do leite de búfala apresentar teores maiores de gordura e proteína quando comparado ao leite de vaca. Esses teores podem apresentar variação quanto a raça, região, alimentação e fase de lactação em que a búfala se encontram (Ahmad, et al. 2013; Akgun et al., 2016).

Os teores de gordura e proteína para o leite bovino obtidos, se encontram próximos aos apresentados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA, 2019) para leite integral, sendo estes de 3,23 g/100g de gordura e 2,93 g/100g de proteína. A mesma comparação quanto aos resultados obtidos pelo leite de búfala, mostra teores superiores apresentados pela TBCA (2019), chegando a 7,02 g/100g de gordura e 3,82 g/100g de proteína.

A determinação do extrato seco desengordurado foi de 9,26% para o leite de búfala e 7,84% para o leite de vaca, apresentando uma diferença significativa entre as matrizes lácteas. O leite de búfala está com o resultado acima do limite mínimo exigido pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do estado de São Paulo de 8,57%. Já os valores obtidos para o leite de vaca se encontram próximos dos resultados de 7,92% e 7,95% obtidos por Venturoso *et al.* (2007). Os resultados da determinação da composição química do leite de búfala foram, de forma geral, condizentes com os encontrados por Sales *et al.* (2017) que obtiveram os teores de 5,73% de gordura, 3,52% de proteína e 9,70% de extrato seco desengordurado.

Em uma comparação semelhante entre a composição nutricional do leite bubalino e bovino, Pignata *et al.* (2014) também apresentaram resultados próximos aos encontrados nesse atual trabalho. Sendo os teores para o leite bubalino e bovino, respectivamente, de gordura em 4,26% e 4,05%, proteína 3,05% e 2,92%, e extrato seco desengordurado em 8,21% e 7,97%.

4.3. Pós-acidificação

O perfil de pós-acidificação dos produtos lácteos elaborados (Tabela 4) mostra diminuição progressiva dos valores de pH ao longo dos 21 dias de armazenamento refrigerado, o que se deve a produção constante, porém com menor intensidade, de ácido láctico pelas bactérias mesmo durante o armazenamento refrigerado (Campos *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017).

Os valores de pH obtidos 24 horas (d1) após a fermentação apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as bebidas lácteas, com exceção das bebidas com 25% de soro em sua composição de ambas as matrizes LB2 e LV2, que mostraram valores próximos de pH 4,37 e 4,46, respectivamente. Após o mesmo período, os produtos lácteos sem adição de soro de leite exibiram os menores valores de pH quando comparadas com as bebidas lácteas, de 4,28 (LB1) e 4,48 (LV1). Tal resultado era esperado, uma vez que as bebidas apresentam diferentes teores de soro de leite e a mistura foi realizada após a fermentação.

Ao sétimo dia (d7) de armazenamento refrigerado é possível observar que as bebidas lácteas bubalinas apresentaram menores decréscimos de pH, sendo estes de 0,01 (LB1), 0,05 (LB2) e 0,09 (LB3), enquanto para as bebidas lácteas bovinas os decréscimos foram de 0,22 (LV1), 0,11 (LV2) e 0,23 (LV3). Essa redução de pH mais acentuada nos primeiros sete dias se deve a presença de atividade metabólica por parte das culturas lácticas, principalmente, *L. bulgaricus*, onde há o consumo da lactose e a produção de ácido láctico (Dualdo *et al.*, 2010).

Os produtos lácteos elaborados não mostraram diferença significativa ($P \geq 0,05$) quanto aos valores de pH obtidos após 14 dias (d14) de armazenamento refrigerado. Embora a bebida láctea bubalina com 50% de soro em sua formulação (LB2) tenha sido o único produto a apresentar um decréscimo de pH (0,03), os demais produtos mostraram um aumento nos valores de pH, principalmente sem soro de leite na sua formulação LB1 e LV1, chegando a apresentar um

aumento de 6,8 e 3,8%, respectivamente, quando comparados com o valores de pH da semana anterior (d7). Comportamento semelhante foi observado por Fernandes *et al.* (2016) em seu estudo sobre a vida de prateleira de iogurtes.

Ao final do período de 21 dias de armazenamento refrigerado (d21), as bebidas apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre si. As bebidas lácteas contendo 25% de soro em sua formulação LB2 (0,08) e LV2 (0,09) mostraram a menor decréscimo de pH quando comparado com os valores que apresentavam em 24 horas de armazenamento. No entanto, a bebida láctea bubalina com 50% de soro, não apresentou diferença significativa ($P \geq 0,05$) nos seu valor de pH ao longo do período de armazenamento.

A redução do pH em produtos lácteos fermentados ao longo do armazenamento refrigerado é relato por outros autores (Dualdo *et al.*, 2010; Gallina *et al.*, 2011; Silva, 2015; Fernandes *et al.*, 2016).

A determinação do perfil de pós acidificação é de grande importância para o controle de qualidade de produtos lácteos fermentados, podendo influenciar em suas características organolépticas e na viabilidade de suas culturas lácticas. Produtos lácteos, em especial iogurtes e bebidas lácteas, que possuem um índice elevado de pós acidificação podem sofrer com alterações físicas, como a separação de fases, reduzir sua aceitabilidade diante do consumidor, devido ao pH ácido demais ao paladar e causar a morte das bactérias ácido lácticas, diminuindo sua viabilidade (Thamer & Penna, 2006; Silva, 2015). No entanto, a legislação brasileira não abrange especificações para os níveis de pH em produtos lácteos, como iogurte, não conferindo limites para tais (BRASIL, 2000).

Tabela 4. Valores de pH das bebidas lácteas em um (d1), sete (d7), catorze (d14) e vinte e um (d21) dias após a fermentação.

Bebidas Lácteas	pH			
	d1	d7	d14	d21
LB1	4,28±0,05 ^{dB}	4,27±0,08 ^{cB}	4,58±0,10 ^{aA}	4,36±0,03 ^{cdB}
LB2	4,37±0,03 ^{cdC}	4,32±0,02 ^{cC}	4,57±0,04 ^{aA}	4,45±0,01 ^{bB}
LB3	4,67±0,03 ^{aA}	4,58±0,01 ^{aA}	4,55±0,11 ^{aA}	4,53±0,02 ^{aA}
LV1	4,48±0,03 ^{bcA}	4,26±0,01 ^{cD}	4,43±0,01 ^{aB}	4,33±0,01 ^{cdC}
LV2	4,46±0,02 ^{cdA}	4,35±0,03 ^{bcB}	4,44±0,02 ^{aA}	4,37±0,01 ^{dB}
LV3	4,66±0,15 ^{abA}	4,43±0,03 ^{bb}	4,53±0,01 ^{aA}	4,39±0,01 ^{cb}

N=3. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes. $P \leq 0,05$. Letras maiúsculas em uma mesma linha são significativamente diferentes. $P \leq 0,05$.

4.4. Enumeração de bactérias viáveis

Para avaliar a população das culturas lácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, utilizadas na fermentação das bebidas lácteas, estas foram enumeradas ao primeiro (d1), sétimo (d7), décimo quarto (d14) e vigésimo primeiro (d21) dia após a fermentação. A Figura 3 mostra a contagem das bactérias viáveis durante o período de análise.

Mesmo a população de *Streptococcus thermophilus* tendo apresentado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as bebidas lácteas, foi a bactéria encontrada em maior quantidade, em torno de 10^8 e 10^9 UFC/mL, e sua viabilidade se mostrou estável durante o período de armazenamento refrigerado, chegando ao d21 variando entre $8,83 \pm 0,02$ e $8,34 \pm 0,03$ logUFC/mL nas bebidas LB1 e LV3, respectivamente. A mesma estabilidade por parte do *S. thermophilus* em bebidas lácteas foi documentada por Ramos *et al.* (2013), Silva (2015) e Mousavi *et al.* (2019). Todas as bebidas lácteas apresentaram queda na viabilidade do *S. thermophilus* entre o primeiro (d1) e o sétimos (d7) dia de análise. Isso pode estar relacionado aos baixos valores de pH nas bebidas no mesmo período, uma vez que o *S. thermophilus* não possuem a mesma tolerância a um pH mais ácido do que as bactérias do gênero Lactobacilos (Dualdo *et al.*, 2010). Contudo, ao 14° dia de armazenamento, as bebidas lácteas exibiram aumento da população de *S. thermophilus* (Figura 3a). Comportamento parecido foi relatado por Mahmood *et al.* (2019) quanto a viabilidade de total de bactérias em iogurtes probióticos com diferentes combinações de culturas lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*). Os autores indicaram que a presença do *L. acidophilus* poderia conferir maior atividade proteolítica, favorecendo a viabilidade celular das demais bactérias.

A população de *Lactobacillus bulgaricus* (Figura 3b) apresentou uma melhor estabilidade nas bebidas lácticas bubalinas, sendo observado diminuição significativa ($P \leq 0,05$) da sua viabilidade nos produtos somente no 21° dia de armazenamento. O produto LB1, elaborado com leite de búfala e sem adição de soro, exibiu a menor variação da população de *L. bulgaricus*, sendo esta de $8,31 \pm 0,15$ log UFC/mL no dia 1 e $8,08 \pm 0,05$ log UFC/mL no dia 21. Os produtos lácteos elaborados com leite de vaca mostraram uma queda mais expressiva da viabilidade de *L. bulgaricus* ao longo do período de armazenamento, principalmente quanto ao produto sem adição de soro (LV1) que apresentou diferença significativa na viabilidade logo entre os dias 1 e 14, onde houve uma diminuição de 1,02 log UFC/mL. Os resultados encontrados se mostraram superiores aos obtidos por Gallina *et al.* (2011), cujo produto em 15 dias apresentou uma redução na população de *L. bulgaricus*, em co-cultura com *S. thermophilus*, de 0,84 log UFC/mL.

Todos os produtos lácteos elaborados, apresentaram diminuição gradativa da população de *Lactobacillus acidophilus* durante do período de estocagem (Figura 3c). Esse comportamento já era esperado, pois o *L. acidophilus* tende a diminuir sua viabilidade em produtos lácteos devido ao aumento de sua acidez ao longo de sua vida de prateleira, que pode afetar as contagens da

bactéria (Dave & Shah, 1997; Ertem & Çakmakçi, 2017). A bebida láctea bovina com 25% de soro (LV2) foi o produto que apresentou as menores variações da viabilidade do probiótico, apenas 0.15 log cfu/mL no período analisado, não havendo diferença significativa entre o 1° e o 21° dia de análise ($P \leq 0.05$). As contagens de *L. acidophilus* no produtos lácteos bubalinos com 0 e 25% de soro em sua composição (LB1 e LB2) não apresentaram diferença significativa entre si ao longo dos 21 dias de armazenamento refrigerado, tendo chegado ao último dia de análise com $7,98 \pm 0,03$ (LB1) e $7,81 \pm 0,05$ (LB2) log UFC/mL do probiótico. As maiores quedas na população de *L. acidophilus* entre os dias 14 e 21, ocorreram nas bebidas lácteas com 50% de soro em sua composição (LB3 e LV3), tendo a bebida láctea bovina (LV3) apresentado a menor viabilidade de bactéria ao final da sua vida de prateleira, $6,93 \pm 0,04$ log cfu/mL. Os resultados obtidos se encontram dentro da faixa de viabilidade relatada por Silva (2015), Ertem and Çakmakçi (2017), Mousavi *et al.* (2019) e Tavakoli, Najafi, and Mohebbi (2019).

De modo geral, as bebidas lácteas probióticas bubalinas apresentaram maior população das culturas lácticas utilizadas. Com os gráficos de contorno (Figura 4) obtidos pelos resultados de viabilidade das culturas lácticas nas bebidas lácteas ao final de 21 dias de armazenamento refrigerado, é possível observar melhor que os pontos referentes aos produtos LB1 e LB2 se encontram mais próximos da área ótima de viabilidade para todas as culturas lácticas. Um maior teor de gordura nos produtos elaborados com leite de búfala pode ter contribuído para melhor estabilidade da viabilidade das bactérias, protegendo-as e aumentando sua resistência a acidez do meio ao longo do armazenamento refrigerado (Verruck *et al.*, 2015).

Para que um produto seja considerado probiótico, a bactéria probiótica precisa estar presente em uma quantidade mínima de 10^6 UFC/mL ou em uma quantidade que possibilite o consumo de 10^8 UFC/mL por porção diária do produto, o que serviria para compensar a possível redução da viabilidade desse probiótico durante a digestão (ANVISA, 2008; GRANATO *et al.*, 2010). Diante disso, os resultados obtidos estão de acordo com o que é preconizado para um produto probiótico.

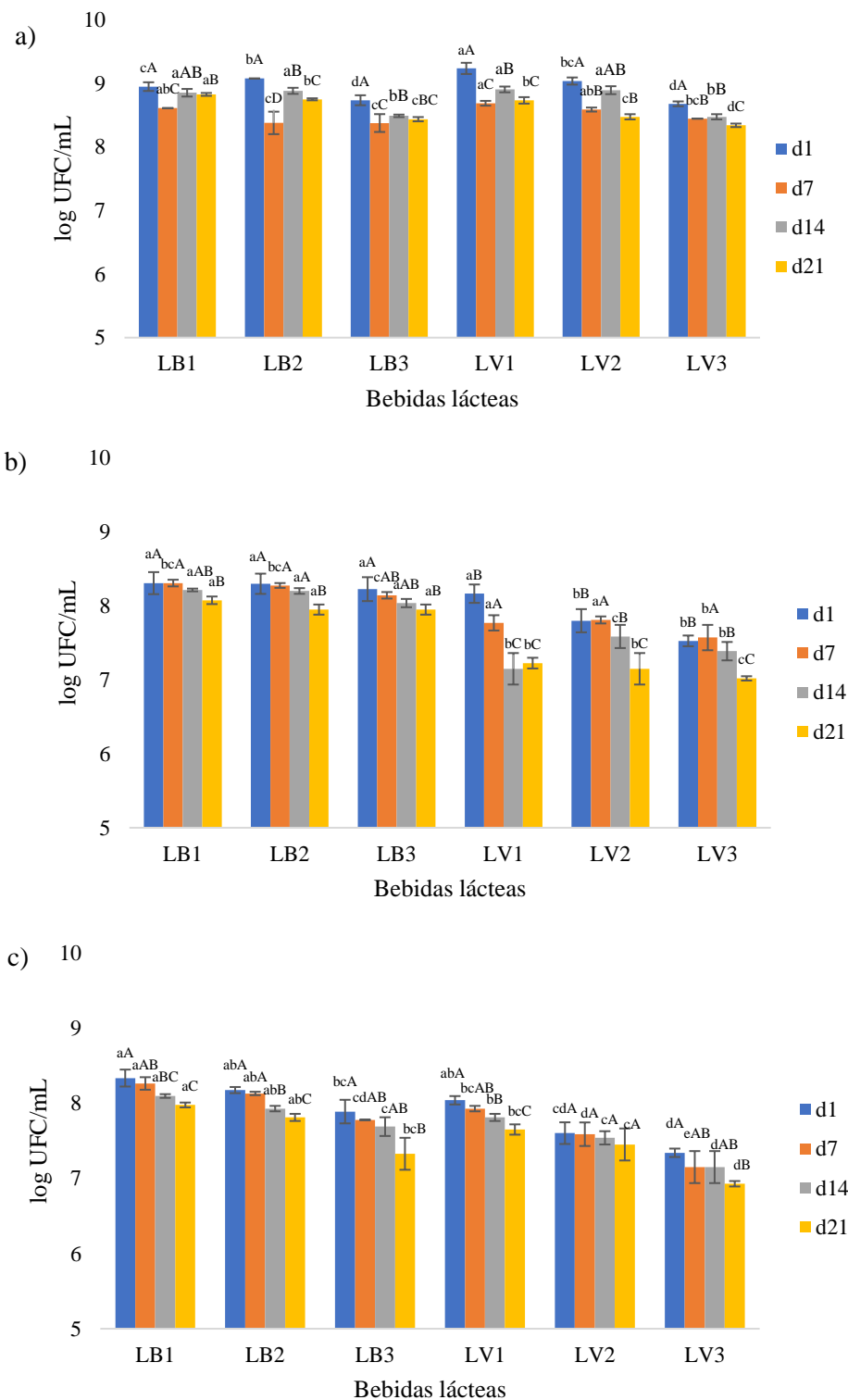


Figura 3. Contagem do número de bactérias viáveis em bebidas lácteas ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado 4°C. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0.05$) entre os produtos lácteos em um mesmo dia. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0.05$) do mesmo produto ao longo do período de análise. N=4.

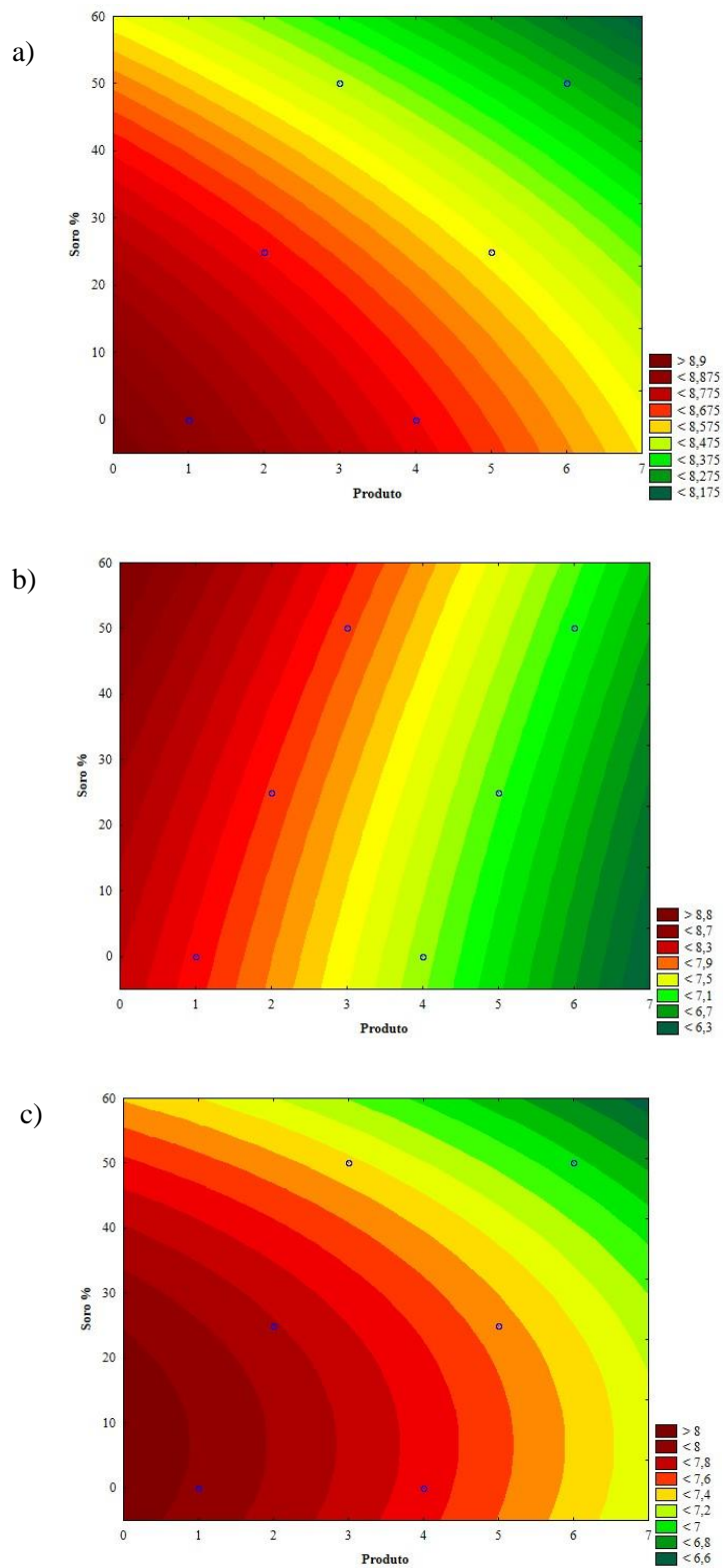


Figura 4. Contorno mostrando o desempenho das bebidas lácteas quanto a população de bactérias viáveis ao final de 21 dias de armazenamento refrigerado 4°C. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; 1) LB1; 2) LB2; 3) LB3; 4) LV1; 5) LV2; 6) LV3.

4.5. Avaliação do estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático

A simulação da sobrevivência ao estresse gastrointestinal *in vitro* permite reproduzir as condições típicas associadas ao sistema digestivo humano, como pH e os sais biliares, tornando possível avaliar a influência que o ambiente gastrointestinal pode ter sobre as bactérias (Uriot et al., 2017). Para isso, a análise foi dividida em 3 fases, sendo estas: gástrica (estômago); primeira fase entérica (intestino delgado); segunda fase entérica (intestino grosso). A viabilidade das bactérias lácticas utilizadas para a fermentação das bebidas lácteas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) durante cada fase da simulação gastrointestinal *in vitro* é apresentada pela Figura 5.

As culturas lácticas apresentaram diminuição progressiva de sua população nas bebidas lácteas no decorrer da análise. Esse comportamento era esperado, uma vez que as condições associadas ao sistema digestivo são muito nocivas e as bactérias tendem a reduzir o número de células viáveis (Verruck et al., 2015).

Antes do início da simulação do processo digestivo (F0), a viabilidade inicial das culturas lácticas nas bebidas era de cerca de 10^8 e 10^9 UFC/mL. Após a fase gástrica (F1), a população das bactérias lácticas diminuiu de forma significativa ($P \leq 0.05$) em todos os produtos. A viabilidade das bactérias *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foi mais afetada nas bebidas lácteas elaboradas com leite de vaca, principalmente na bebida contendo 50% de soro em sua composição (LV3) que apresentou uma redução de 3,66 e 4,11 log UFC/mL, respectivamente, na viabilidade das bactérias. O *L. acidophilus*, além das bebidas lácteas bovinas, mostrou redução significativa do seu número de células viáveis também na bebida láctea bubalina com 50% de soro de leite em sua composição (LB3), exibindo uma viabilidade de $5,08 \pm 0,05$ logUFC/mL ao final da fase gástrica, $3,12$ log UFC/mL a menos que a viabilidade inicial.

Na primeira fase entérica (F2), a população de *L. bulgaricus* diminuiu drasticamente, chegando a não apresentar células viáveis na bebida láctea bovina LV3 ao final desta fase. Tanto *S. thermophilus* quanto *L. acidophilus* exibiram queda gradativa na contagem de células viáveis nas bebidas lácteas, também tendo a bebida láctea LV3 como o produto com a menor viabilidade, onde foram encontrados na concentração de $2,22 \pm 0,13$ log UFC/mL e $1,93 \pm 0,02$ log UFC/mL, respectivamente. A ação da bile nessa fase da análise pode ter contribuído para uma redução tão intensa na viabilidade das bactérias estudadas, visto que a bile pode afetar os fosfolípidios e as proteínas da membrana da bactéria, dificultando a homeostase celular (Begley et al., 2005).

Ao final da última fase da análise, a segunda fase entérica (F3), a bebida láctea LV3 não apresentava células viáveis de nenhuma das culturas utilizadas. Também não foram encontradas células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* na bebida láctea bovina contendo 25% de soro em sua composição (LV2), porém a população detectada de *L. acidophilus* foi de $2,42 \pm 0,13$ log UFC/mL. Embora em viabilidade reduzida, o *L. acidophilus* se manteve viável nos demais produtos, sendo encontrado em maior quantidade no produto LB1 com $4,85 \pm 0,05$ log UFC/mL

seguido da bebida láctea LB2 com $4,19 \pm 0,06$ log UFC/mL. Era esperado que o *L. acidophilus* apresentasse maior capacidade de sobrevivência, pois bactérias probióticas tolerarem ambientes com pH mais baixo e mais estressantes, considerando que essa resistência seja um dos critérios para selecioná-las (Faria, 2017). Em seu estudo sobre a sobrevivência de *L. acidophilus* em leites fermentados com diferentes farinhas de frutas, Casarotti e Penna (2015) reportaram resultados semelhantes em que o *L. acidophilus* se manteve viável nos produtos estudados ao final da simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*.

A figura 6 mostra os gráficos de contorno representando a população das culturas lácteas nos produtos ao final da segunda fase entérica (F3). É possível observar através da distribuição dos pontos nos gráficos de contorno que os produtos elaborados a partir do leite de búfala estão mais próximos da área ótima de viabilidade para todas as bactérias utilizadas. Novamente, o teor mais elevado de gordura nesses produtos pode ter contribuído para proporcionar maior resistência as bactérias durante as condições de simulação gástrica da análise.

Com exceção das bebidas lácteas LV2 e LV3, *S. thermophilus* se manteve viável nos produtos lácteos elaborados, com sua população variando de $4,65 \pm 0,21$ log UFC/mL (LB1) a $2,41 \pm 0,11$ log cfu/mL. Isso reforça resultados relatados de que, embora durante muito tempo tenha se acreditado que o *S. thermophilus* seria incapaz de sobreviver ao processo digestivo, este possui resistência às condições seletivas relacionadas ao trato gastrointestinal (Fang, Lai, & Chou, 2013; Ziar, Gérard, & Riazi; 2014; Junjua *et al.*, 2016; Uriot *et al.*, 2017). Segundo Uriot *et al.* (2017), essa capacidade seria cepa dependente, estando relacionada também ao tipo de fonte de carbono disponível no meio, bem como pelas estruturas de polissacarídeos extracelular produzidas pela bactéria. Ziar, Gérard e Riazi (2014) observaram maior resistência de *S. thermophilus* a ação da bile em meios que havia lactose como única fonte de carbono. Além de contribuir de forma positiva para a saúde humana, a produção de polissacarídeos por *S. thermophilus* também foi relacionada com aumento de sua resistência as condições nocivas por Boke, Aslim e Alp (2010), que apontaram um efeito protetivo dessas estruturas extracelulares.

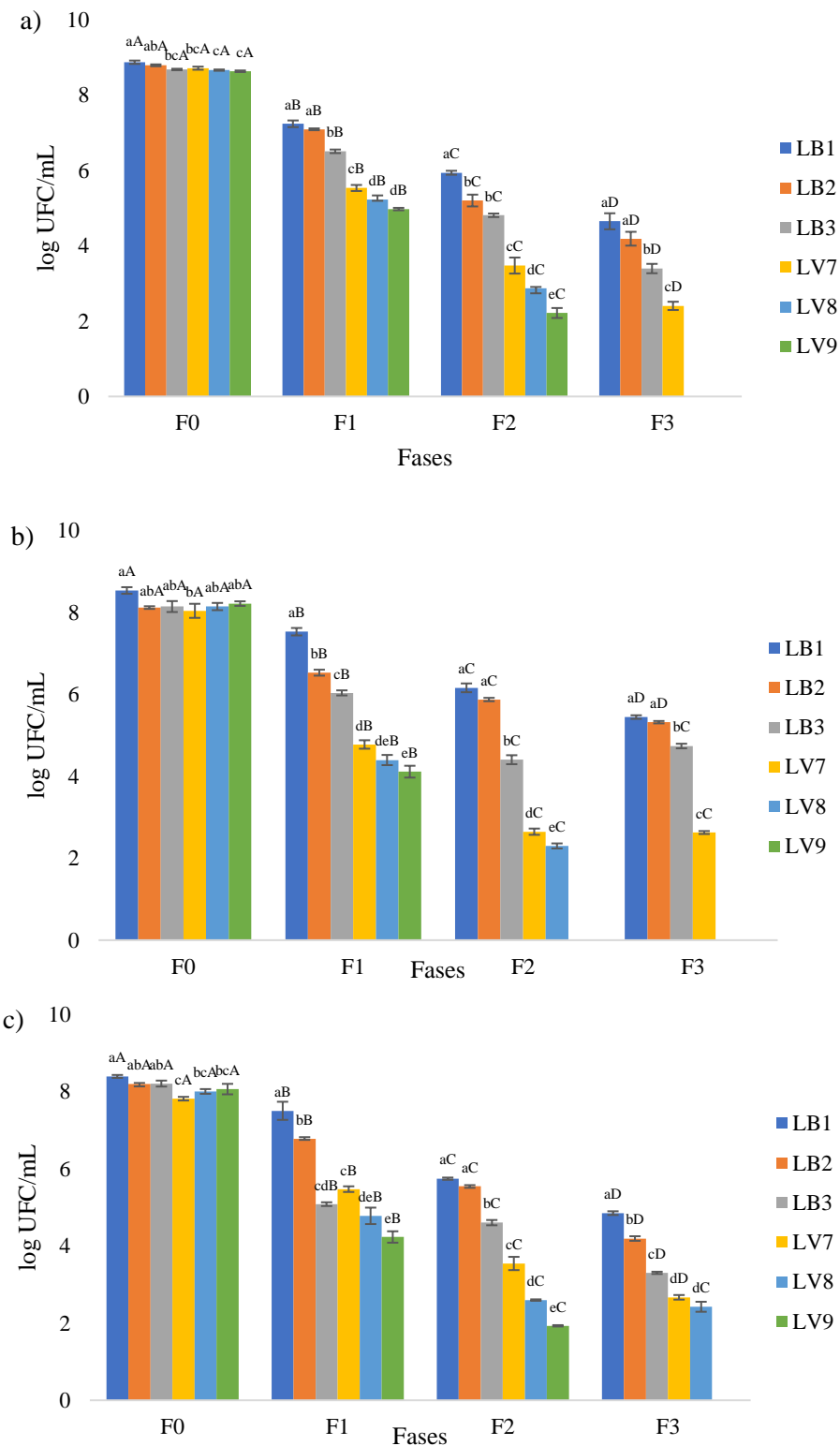


Figura 5. Viabilidade das culturas fermentadoras em bebidas lácticas durante a simulação gastrointestinal in vitro. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; F0 – tempo zero, antes do início da análise; F1- fase gástrica (2 horas); F2 - primeira fase entérica (4 horas) ; F3 - segunda fase entérica (6 horas). N=3.

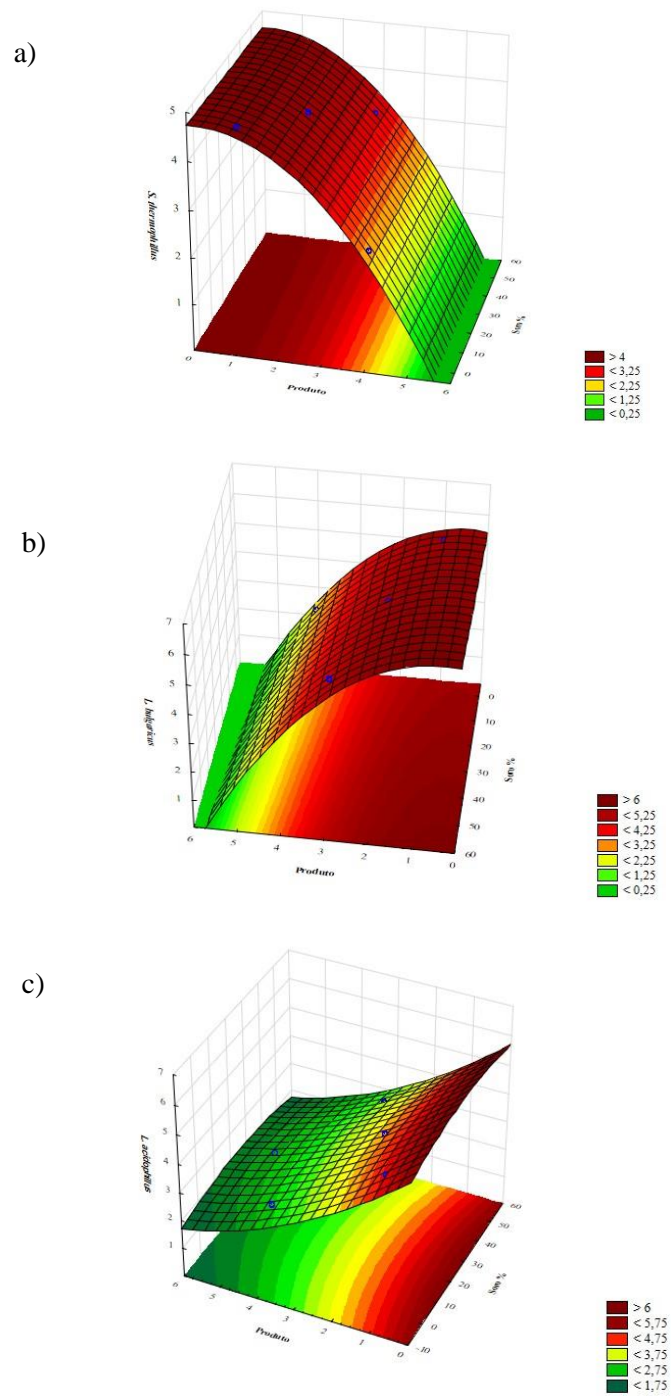


Figura 6. Contorno mostrando a população das culturas lácteas ao final da análise de simulação de estresse gastrointestinal *in vitro*. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; 1) LB1; 2) LB2; 3) LB3; 4) LV1; 5) LV2; 6) LV3.

5. CONCLUSÕES

Foi possível estimar que o uso do leite de búfala para a elaboração de produtos lácteos apresentou benefícios, principalmente, quanto a preservação da viabilidade das bactérias utilizadas.

Os parâmetros cinéticos não apresentaram diferença significativa quanto a fermentação realizada no leite de búfala e de vaca.

Os teores de gordura, proteína e extrato seco desengordurado foram observados em maior quantidade nas bebidas lácteas bubalinas com 0 e 25% de soro (LB1 E LB2).

Os produtos elaborados com leite de búfala apresentaram baixa pós-acidificação, exibindo pouca variação dos valores de pH ao longo do período de armazenamento.

A viabilidade das bactérias utilizadas foi melhor preservada nas bebidas lácteas elaboradas com leite de búfala ao longo do armazenamento refrigerado, principalmente nos produtos LB1 e LB2. Todas bebidas lácteas apresentaram a viabilidade recomendada do probiótico *L. acidophilus* para serem consideradas probióticas

Da mesma forma, durante a simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*, as bactérias utilizadas na produção dos produtos apresentaram maior sobrevivência ao ensaio, indicando o leite de búfala como uma boa matriz láctea de veiculação de probiótico.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, S.; ANJUM, F. M.; HUMA, N.; SAMEEN, A.; ZAHOOR, T. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, mineral, enzymes and vitamins. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, p. 62 – 74, 2013.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.29, n.2, p.106-110, 2005.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, p. 382 – 389, 2013.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. *Microbiology Reviews*, V. 29, p. 625–651, 2005.

BOKE, H.; ASLIM, B.; ALP, G. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. **Archives of Biological Science Belgrade**, v. 62, p. 323 – 328, 2010.

- BRASIL. (2005). **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.16.** Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasil.
- CAMPOS, D. C. S.; NEVES, L. T. B. C.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUSA, B. O. Post-acidification and evaluation of anthocyanins stability and antioxidant activity in açai fermented milk and yogurts (*Euterpe oleracea Mart.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 5, e-871, 2016.
- CASAROTTI, S. N.; BORGONNOVI, T. F.; BATISTA, C. L. F. M.; PENNA, A. L. B. Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **Food Science and Technology**, v. 98, p. 69–76, 2018.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31 – 41, 1996.
- DUALDO, L. C. S.; CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema compact dry® tc durante estocagem refrigerada de iogurtes. **Rev. Inst. Latic.** n. 374, v. 65, p. 33-40, 2010.
- ERTEM, H.; ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and *Gobdin*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 776–783, 2017.
- FANG, S.; LAI, Y.; CHOU, C. The susceptibility of *Streptococcus thermophilus* 14085 to organic acid, simulated gastric juice, bile salt and disinfectant as influenced by cold shock treatment. **Food Microbiology**, v. 33, p. 55 – 60, 2013.
- FAO/WHO (2002). **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, ON, Canada: FAO/WHO.
- GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. K. H. S.; CARUSI, J. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde**; v. 13, n. 4, p. 239-44, 2011.
- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. DE A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. Comprehensive Reviews in **Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 455 – 470, 2010.
- GUIMARÃES, D. H. P.; SILVA, F. R. S. R.; LÊNTHOLA, N. M. Dairy Products Production with Buffalo Milk. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.3, 2014
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B., MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506 – 514, 2014.

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. 533p.

JUNJUA, M.; KECHAOU, N.; CHAIN, F.; AWUSSI, A. A.; ROUSSEL, Y.; PERRIN, C., ROUX, E.; LANGELLA, P.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; ROUX, Y.; CHATEL, J.; DARY-MOUROT, A. A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. **Food of Science and Technology**, v. 70, p. 78 – 87, 2016.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 283 – 308, 2011.

MAGALHÃES, K.; DRAGONE, G.; PEREIRA, G. V. M.; OLIVEIRA, J. M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, p. 249 – 253, 2011.

MISHRA, S.; MISHRA, H. N. Effect of Synbiotic Interaction of Fructooligosaccharide and Probiotics on the Acidification Profile, Textural and Rheological Characteristics of Fermented Soy Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n.11, p.3166 – 3176, 2013.

PARKER, E. A.; ROY, T.; D'ADAMO, C. R.; WIELAND, L. S. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, p. 125 – 134, 2018.

RAMOS, A.C.S.M.; STAMFORD, T.L.M.; MACHADO, E.C.L.; LIMA, F.R.B.; GARCIA, E.F.; ANDRADE, S.A. C.; SILVA, C.G.M. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.2817-2828, 2013.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619 – 625, 2012.

ROHLFES, A. L. B.; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M. S. R.; MARQUARDT, L.; RICHARDS, N. S. P. S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-lógica**, v.15, n.2, p.79-83, 2011.

SACCARO, D.M.; HIROTA, C.Y.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, v.5 n.23, p.3901-3906, 2011.

SFAKIANAKIS, P.; TZIA, C. Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: A Review. *Foods*, v. 3, p. 176-193, 2014.

SILVA, T. M. S. **Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado**. São Paulo, 2015. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

- TAVAKOLI, M.; NAJAFI, M. B. H.; MOHEBBI, M. Effect of the milk fat content and starter culture selection on proteolysis and antioxidant activity of probiotic yogurt. **Heliyon**, v.5, e01204, 2019.
- THAKUR, N.; ROKANA, N.; PANWAR, H. Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and disease. **Journal of Innovative Biology**, v. 3, p. 259 – 270, 2016.
- URIOT, O.; DENIS, S.; JUNJUA, M.; ROUSSEL, Y.; DARY-MOURIT, A.; BLANQUET-DIOT, S. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 74 – 89, 2017.
- VENTUROSO, R. C.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; DAMIN, M. R.; OLIVEIRA, M. N. Determinação da composição físico-química de produto lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, 2007.
- VERRUCK, S.; PRUDÊNCIO, E. S.; VIEIRA, R. W.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of Bifidobacterium BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 1179 – 1183, 2015.
- VOS, W. M.; VOS, E. A. J. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 45 – 56, 2012.
- WEI, Z.; ZHANG, W.; WANG, Y.; WANG, J. Monitoring the fermentation, post-ripeness and storage processes of set yogurt using electronic tongue. **Journal of Food Engineering**, v. 203, p. 41- 52, 2017.
- YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v. 23, p. 63-68, 2007.
- ZHOU, L.; TANG, Q.; IQBAL, M. W.; XIA, Z.; HUANG, F.; LIANG, M.; LIN, B. O.; QIN, G.; ZOU, C. A comparison of milk protein, fat, lactose, total solids and amino acid profiles of three different buffalo breeds in Guangxi, China. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, p.873 – 878, 2018.
- ZIAR, H.; GÉRARD, P.; RIAZI, A. Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94. p. 1184 – 1190, 2014.

• **CAPÍTULO** •

3

Caracterização de bebidas lácteas probióticas elaboradas a partir de leite bubalino e bovino adicionada de polpa de morango

RESUMO

No Brasil, as produções de bebidas lácteas probióticas representa uma boa alternativa para o reaproveitamento do soro de leite proveniente da indústria queijeira. Mesmo o uso do leite de búfala na elaboração de bebidas lácteas contribuir para uma maior qualidade no produto final, o odor característico do leite pode afetar a aceitabilidade do produto. A adição de polpa de morango pode ajudar a mascarar esse odor e conferir um sabor mais agradável as bebidas lácteas bubalinas. No entanto, é necessário avaliar o efeito da adição da polpa de morango quanto a estabilidade dos produtos. Assim, esse estudo se propõe avaliar objetivo avaliar o efeito da adição de polpa de morango em bebidas lácteas probióticas bubalina e bovinas. Para isso, foram elaboradas bebidas lácteas a partir de leite de búfala e leite de vaca com 25% de soro, recebendo ou não adição de um preparado de polpa de morango. As bebidas lácteas produzidas foram avaliadas quanto a aos teores de proteína, gordura, perfil de pós acidificação, características reológicas, perfil de ácido graxo, viabilidade e resistência a simulação gastrointestinal *in vitro* das culturas lácticas ao longo de 21 dias de armazenamentos refrigerado. A adição do preparado de polpa de morango às bebidas lácteas, resultou em produtos com menor teor de gordura e proteína. As bebidas lácteas frutadas apresentaram pH mais ácido ao longo da vida de prateleira quando comparadas aos seus controles, tendo a bebida láctea bubalina exibido um perfil de pós-acidificação reduzido durante o período analisado. A adição da polpa de morango influenciou benéficamente quanto a consistência e viscosidade das bebidas lácteas. A bebida láctea bubalina adicionada de polpa de morango apresentou quantidades superiores em cerca de 40 e 78%, respectivamente, para os ácidos linoleico conjugado (C:18:2, CLA) e linolênico (C:18:3, n-3) do que a bebida láctea bovina. As culturas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, foram encontradas em maior quantidade nas bebidas lácteas bubalinas, onde mantiveram sua viabilidade em torno de 8 log UFC/mL, sendo que a adição do preparado de frutas não afetou negativamente a viabilidade das bactérias. As bebidas lácteas bubalinas com e sem adição do preparado de polpa de fruta, foram as únicas a apresentarem células viáveis de todas as culturas ao final do ensaio de avaliação a sobrevivência gastrointestinal *in vitro*, tendo a matriz láctea bubalina proporcionando um efeito protetivo às bactérias presentes nos produtos.

Palavras-chave: bebidas lácteas probióticas, leite de búfala, polpa de morango, reologia,

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por bebida láctea, o produto produzido a partir da mistura de uma base láctea, fermentada ou não, com soro de leite (Brasil, 2005a). A produção de bebidas lácteas no Brasil é uma das opções mais rentáveis e atrativas de aproveitamento do soro de leite, subproduto das indústrias queijeiras, cujo uso confere benefícios nutricionais e melhora o custo/benefício do produto (Caldeira *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2013).

As bebidas lácteas fermentadas probióticas possuem em sua composição micro-organismos que, quando consumidos em quantidade apropriada, são capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.* 2014). Os benefícios associados ao consumo de produtos probióticos se concentram, principalmente, na melhora da imunidade através do equilíbrio da microbiota (Parker *et al.*, 2018). Isso proporciona que as bebidas lácteas probióticas atendam a demanda dos consumidores que buscam alimentos que vão além dos benefícios nutricionais básicos (Silva, 2015).

Os produtos lácteos fermentados elaborados a partir de matrizes lácteas alternativas, como leite bubalino, podem apresentar qualidade distinta e superior quando comparados aos produtos elaborados com leite bovino (Pignata *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2015). Isso se deve aos elevados teores de gordura e proteína presentes no leite de búfala, que conferem ao produto final melhor um gel de maior estabilidade e um coágulo de melhor qualidade (Mathias *et al.* 2013). No entanto, leites que exibem um teor elevado de gordura, como leite de búfala, cabra e de ovelha, sofrem rejeição pelo mercado consumidor por apresentarem sabor e odor característico (Marinho *et al.*, 2012).

A adição de polpa de frutas as bebidas lácteas bubalinas probióticas, além de contribuir nutricionalmente com o produto, pode ajudar a mascarar o sabor característico do leite de búfala, proporcionando um produto de sabor mais agradável e melhorar aceitabilidade do consumidor (Marinho *et al.*, 2012). Da mesma forma, a mistura de frutas a produtos lácteos pode influir em aspectos tecnológicos desejáveis, influenciando no aumento da viscosidade e consistência do produto (Silva, 2015). Em especial, a adição de polpa de morango pode contribuir para melhora da qualidade funcional das bebidas lácteas, por apresentar elevados teores de compostos bioativos com grande potencial antioxidante (Siqueira *et al.*, 2013; Silva, 2015).

Embora a adição de polpa de fruta possa promover benefícios sensoriais e nutricionais às bebidas lácteas probióticas e outros lácteos fermentados, é necessário avaliar o efeito essa adição pode causar na estabilidade do produto. Por se tratar de produtos com o pH mais baixo, decorrente do processo fermentativo, a adição de frutas às bebidas lácteas poderia afetar a pós-

acidificação do produto, contribuindo para aumento da sua acidez, e reduzir a viabilidade das culturas probióticas utilizadas na elaboração dos produtos (Capuchinho, 2018; Silva, *et al.* 2020).

Diante disso, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da adição de polpa de morango em bebidas lácteas bubalina e bovinas, caracterizando-as quanto ao perfil de pós-acidificação, teores de gordura e proteína, viabilidade e resistência a simulação gastrointestinal *in vitro* das culturas lácticas utilizadas na fermentação, reologia e o perfil de ácidos graxos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Ingredientes

As bebidas lácteas probióticas foram elaboradas a partir de leite e soro de bubalino e bovino, fermentadas com culturas lácticas e adicionadas de preparado de polpa de morango.

O leite bubalino pasteurizado utilizado é proveniente de búfalas da raça Murrah e foi fornecido pela Fazenda Montenegro (Sorocaba, São Paulo, Brasil). O leite bovino pasteurizado (Fazenda Bela Vista, Tapiratiba, São Paulo, Brasil) foi adquirido diretamente de lojas de varejo.

A obtenção dos soros de leite, bubalino e bovino, foi realizada através do preparo artesanal de queijos Minas Frescal. O soro de leite obtido foi pasteurizado e armazenado sob refrigeração por 24 horas antes do uso.

O preparado de polpa de morango foi obtido através mistura de polpa de morango (60%) com açúcar (40%). Essa mistura foi realizada no equipamento Thermomix (Vorwerk & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha), pasteurizada e armazenada sob refrigeração por 24 horas antes do uso.

2.1.2. Culturas bacterianas

As culturas lácticas utilizadas para a fermentação das bebidas foram: *Streptococcus thermophilus* TA040 (DuPont, França), *Lactobacillus bulgaricus* LB340 (DuPont, França) e *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen, Dinamarca).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Elaboração das bebidas lácteas

2.2.1.1. Delineamento Experimental

O delineamento experimental para a elaboração das bebidas lácteas está descrito na Tabela 1 e consiste em 4 produtos distintos que se diferem entre si quanto ao tipo de leite utilizado (bubalino ou bovino) e a adição ou não da polpa de morango. Os produtos foram elaborados com base na mistura dos leites fermentados (75%) com soro de leite (25%), recebendo ou não adição de polpa de morango, correspondendo a 20% do peso do produto finalizado. As bebidas lácteas sem polpa de morango foram utilizadas como controle.

As bebidas lácteas elaboradas foram caracterizadas e avaliadas quanto aos teores de gordura, proteína e extrato seco desengordurado, perfil de pós acidificação, população das culturas lácticas utilizadas na fermentação (*Streptococcus thermophilus* (St), *Lactobacillus bulgaricus* (Lb) e *Lactobacillus acidophilus* (Lb), perfil de ácidos graxos, reologia e simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*.

Tabela 1. Delineamento experimental para a elaboração de bebidas lácteas probióticas com polpa de morango.

Ensaio	Leite	Base láctea		Polpa de Morango %
		Soro de leite %	Leite %	
LB1	Búfala	25	75	0
LB2	Búfala	20	60	20
LV1	Vaca	25	75	0
LV2	Vaca	20	60	20

2.2.1.2. Fermentação

Primeiramente, os leites utilizados para a elaborar as bebidas lácteas fora submetido a um tratamento térmico de 90° por 5 minutos através do equipamento Thermomix (Vorwek & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha) e, então, foram transferidos para frascos estéreis do tipo Schott, resfriados em banho de gelo e armazenados a 4°C por 24 horas antes da fermentação.

O tratamento térmico, além de eliminar micro-organismos contaminantes, estimula o crescimento inicial das culturas fermentadoras por diminuir o oxigênio do leite. Adicionalmente, promove a desnaturação das proteínas do soro e a contração do coágulo da caseína, diminuindo a

sinérese, em iogurtes, e proporcionando uma maior viscosidade e melhor textura ao produto final (Robert, 2008).

As culturas lácticas (*S. thermophilus*, *L. burgaricus* e *L. acidophilus*) foram cultivadas em caldo M17 (Difco, Le Pont de Claix, França) (St) e MRS (Difco, Le Pont de Claix, França) (Lb e La) por 24 horas a 37°C. No dia da fermentação, os tubos contendo as culturas lácticas foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. O conteúdo precipitado foi lavado com solução salina (0,85%) e o tubo foi, novamente, centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. A etapa de lavagem foi executada 3 vezes, tendo os precipitados sendo, por fim, ressuspensionado em leite estéril. Desses inóculos finais, foram retiradas alíquotas e adicionadas aos frascos Schott contendo o leite a ser fermentado, de forma que possibilitasse uma população inicial de ~5.0 logUFC/mL.

Os frascos Schott contendo os leites inoculados, foram encaminhados para o banho-maria pré-aquecido a 42°C e acoplados ao sistema CINAC - *Cinétique d'acidification* (Ysebaert, Frépillon, França), que permitiu o monitoramento da fermentação até atingir o pH de 4,7. Quando a fermentação atingiu o pH desejado de 4,7, esta foi interrompida manualmente e os frascos com os leites foram refrigerados em banho de gelo por 10 minutos, para a completa interrupção do processo fermentativo. Por fim, foi realizada a quebra do coágulo das bases lácteas fermentadas, utilizando um bastão de aço inoxidável contendo um disco perfurado, com movimentos verticais durante 60 segundos (Silva, 2015).

2.2.1.3. Preparo das bebidas lácteas

Para o preparo das bebidas lácteas bubalina e bovina sem adição de polpa de morango (LB1 E LV1), usadas como controle, as bases lácteas fermentadas e o soro de leite foram misturados no equipamento Thermomix (Vorwek & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha).

As bebidas lácteas saborizadas com morango (LB2 e LV2) foram preparadas através da mistura das bases lácteas fermentadas (60%), soro de leite (20%) e do preparado de polpa de morango (20%) com o uso do equipamento Thermomix (Vorwek & Co. KG, TM31, Wuppertal, Alemanha).

Após a mistura dos componentes nas proporções descritas, as bebidas lácteas foram envasadas em frascos plásticos de 50 mL e encaminhadas para o armazenamento refrigerado.

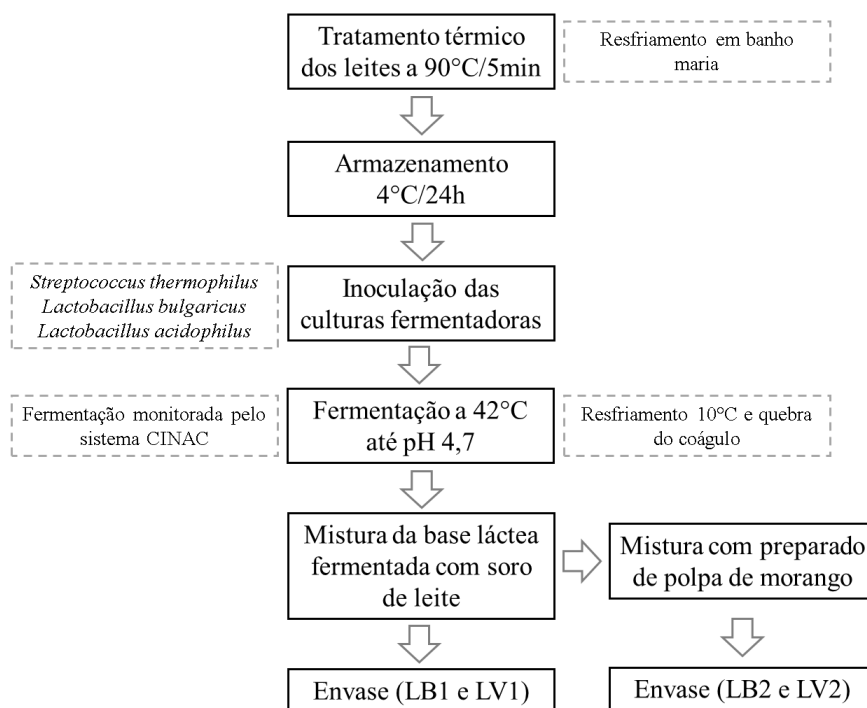


Figura 1. Fluxograma de preparo das bebidas lácteas probióticas elaboradas. Onde: (LB1) bebida láctea bubalina controle; (LB2) bebida láctea bubalina com polpa de morango; (LV1) bebida láctea bovina controle; (LV2) bebida láctea bovina com polpa de morango.

2.2.2. Determinação de gordura e proteína

2.2.2.1. Determinação de gordura pelo Método de Gerber

O método de Gerber é o mais utilizado para determinar a gordura no leite. O método se baseia na quebra da emulsão do leite, o que ocorre pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, aliado a centrifugação.

Para a análise, foram transferidos 10 mL de ácido sulfúrico em um butirômetro. Em seguida, adicionou-se 11 mL do leite lentamente, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. Por último, foi adicionado 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi tampado com uma rolha e, usando uma luva térmica, foi agitado cuidadosamente até completa dissolução. O butirômetro foi então centrifugado por 15 min a 1200 rpm e passado para um banho (65°C) durante 3 minutos com as rolhas para baixo. Ao final do procedimento, houve a separação da parte lipídica do leite que permite, através do manejo da rolha voltada para baixo, ajustar o menisco na parte graduada. O resultado já é expresso em porcentagem de gordura presente na amostra (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985).

2.2.2.2. *Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl*

Primeiramente, pesou-se 1 g de amostra em um tubo de digestão, adicionando um comprimido de catalisador de Kjeldahl (composto por 6,25% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em sulfato de potássio) e, em seguida, 20 mL de ácido sulfúrico.

Os tubos foram passados para o digestor, onde a digestão foi realizada a uma temperatura de 350 a 420°C por 2 horas, onde a amostra apresentou uma coloração verde clara translúcida.

Após esfriarem, os tubos foram colocados no destilador, tendo um Erlenmeyer com 50 mL de ácido bórico contendo fenolftaleína no final do equipamento. A destilação foi realizada adicionando hidróxido de sódio à amostra no tubo de digestão. Quando o volume no Erlenmeyer chegou a 150 mL, a destilação foi concluída. Esse volume foi titulado com ácido clorídrico 0,1N e o valor gasto foi utilizado para calcular a percentagem de nitrogênio nas amostras (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985).

Sendo: N = Normalidade da solução de NaOH;

V1= Volume do titulante gasto na amostra (mL);

V0= volume de titulante gasto no ensaio em branco (mL);

m = massa da amostra em (g);

Com o resultado dessa equação, foi possível calcular a percentagem de proteína utilizando a equação: % Proteína = % Nitrogênio*6,38

2.2.3. Pós-acidificação

O perfil de pós-acidificação das bebidas lácteas probióticas produzidas foi analisado por meio da medição dos valores de pH, através de potenciômetro digital (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), ao longo de seu armazenamento refrigerado. As medições do pH foram realizadas em triplicata após 1 (d1), 7 (d7), 14(d14 e 21 (d21) dias após da fermentação.

2.2.4. Reologia

Os parâmetros reológicos das bebidas lácteas bubalinas e bovinas foram determinados com o uso do reômetro rotacional Rheotest modelo RN 3.1, que possui um copo fixo e um cilindro interno móvel, cuja rotação permite uma variação de 0 a 1000 rpm. O reômetro é acoplado a um banho temostarizado, o que permitiu o controle da temperatura durante a análise, conduzida a 5°C.

Para a análise, 35 mL de amostra foram inseridos no copo do reômetro, cujo diâmetro interno é de 38 mm, e o cilindro concêntrico foi utilizado como sensor, com diâmetro de 35,04 mm e altura de 52,56 mm. A análise foi realizada com taxa controlada de 400/1s, determinada a

partir de ensaios anteriores. Os parâmetros para os modelos de Ostwald-de Walle, Bingham e Herschel Bulkley foram calculados através do Software do equipamento.

As análises foram realizadas em triplicata após 1 (d1), 7 (d7), 14 (d14) e 21 (d21) dias de armazenamento refrigerado.

2.2.5. Perfil de ácidos graxos

O Perfil de ácidos graxos das bebidas lácteas produzidas foi realizada por meio de cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo modelo 3400CX (Varian, São Paulo, Brasil), posterior a extração dos lipídios (ISO/IDF, 2001) e do preparo de ésteres de metil, transesterificação (ISO/IDF, 2002).

Para a extração da parte lipídica das amostras de bebidas lácteas, seguiu a metodologia proposta pelo ES ISO 14156:2012 (Milk and Milk products – Extraction Methods for lipids and liposoluble compounds) com algumas adaptações. Primeiramente, 100 mL da amostra foram misturados a 80 mL de etanol e 20 mL de hidróxido de amônio em funis de separação. Em seguida, foram adicionados 100 mL de éter etílico, misturando-se vigorosamente por 1 minuto. Após um repouso, onde é observado a separação de fases, foi adicionado 100 mL de n-hexano ao funil e este, por sua vez, foi agitado cuidadosamente e mantido em repouso por 15 minutos. Depois da separação total de fases, a fase aquosa foi descartada e 100 mL de solução de sulfato de sódio (10%) foram adicionados e o funil foi homogeneizado lentamente. A fase orgânica foi transferida para um Erlenmeyer contendo de 6g de sulfato de sódio, o qual foi agitado e, após repouso de 10 minutos, teve o seu conteúdo filtrado em balões de fundo redondo. Os balões, então, foram conduzidos ao rotaevaporador medole IKA RV 10 Digital em banho-maria a 50 ± 2 °C até que os solventes fossem totalmente evaporados, tendo o restante do conteúdo sido encaminhado para secagem com nitrogênio gasoso.

Após a extração, foi realizada a transesterificação de acordo com a metodologia sugerida pelo ISO 15884:2002 (Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters). Para isso, 100 mg da amostra extraída foi adicionada em 5 mL de n-hexano em um tubo de ensaio com tampa. Então, 0,2 mL de reagente de transesterificação, obtido pela mistura de KOH com metanol, foi adicionado e o tudo foi agitado em vórtex. Após 5 minutos de repouso, 0,5 g de sulfato de sódio anidro foi adicionado e o tudo agitado, novamente. As amostras foram centrifugada por 3 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi reservado e encaminhado para cromatografia.

A análise foi realizada em triplicata no início (d1) e ao final (d21) do período de armazenamento refrigerado.

2.2.6. Enumeração de bactérias viáveis

Para a enumeração da população as bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, amostras de 1 mL das bebidas lácteas foram adicionadas a 9 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizadas durante 1 min em um agitador de tubo. No mesmo diluente, foram feitas diluições seriadas e a inoculação destas em meios seletivos. O meio de cultura ágar M17 (Difco, Le Pont de Claix, França) foi utilizado para enumerar a bactéria *S. thermophilus* enquanto a enumeração de *L. bulgaricus* foi realizada ágar MRS (Difco, Le Pont de Claix, França) com o pH ajustado para 5,4, tendo ambas bactérias tido sido incubadas a 37°C por 72 horas. Os meios citados foram preparados de acordo com recomendações de Saccaro *et al.* (2011). O *L. acidophilus* foi enumerado em meio modificado ágar MRS adicionado de solução de maltose 50% e após incubação a 37°C por 72h em jarra de anaerobiose de acordo com a metodologia descrita por Dave e Shah (1996) e Saccaro *et al.* (2011). As condições de anaerobiose foram estabelecidas usando-se AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke). Placas contendo de 30 a 300 colônias selecionadas para serem enumeradas e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL de produto (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata e em períodos pré-determinados, a seguir: d1 (24 h); d7 (sete dias) d14 (catorze dias) e; d21 (vinte e um dias) após a fermentação.

2.2.7. Avaliação do estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático

A resistência ao estresse gastrointestinal *in vitro* das bactérias lácticas, mostrando sua capacidade de sobrevivência ao processo digestivo, foi avaliada nas bebidas lácteas no sétimo dia de armazenamento refrigerado através modelo de digestão estática adaptado de Bedani *et al.*, (2013). Esse modelo é dividido em três fases: (i) gástrica (estômago), (ii) primeira fase entérica (intestino delgado) e (iii) segunda fase entérica (intestino grosso). A análise possui uma duração total de 6 horas, sendo que cada fase apresenta a duração de 2 horas. Ao final de cada fase, alíquotas das amostras foram retiradas para a enumeração das bactérias viáveis, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.5.

Para a análise, primeiramente foi feita a diluição de 25 mL de amostra de bebida láctea em 225 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Desta diluição inicial, retirou-se 10 mL e transferiu-se para um frasco tipo Schott de 100 mL.

Na fase gástrica (i), o pH das amostras foi ajustado para cerca de 2,4 – 2,7 utilizando HCl 1N. Foram, então, adicionadas soluções de pepsina (Pepsina, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) e lipase (Amano lipase G, from *Penicillium camemberti*,

Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) em concentrações de 3,0 g/L e 0,9 mg/L respectivamente. Em seguida, os frascos foram incubados em banho metabólico (Maxi-Shake, Heto, Brasil) a 37°C em agitação de 150 rpm durante 2 horas. Na primeira fase entérica (ii) o pH foi aumentado para 6,0 – 6,3 utilizando de uma solução de 1N de NaOH em tampão fosfato. Posteriormente, foram adicionadas soluções de 10 g/L de bile (Bile extract, porcine, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) e 1 g/L de pancreatina (Pancreatina 3 NF, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil), antes dos frascos novamente serem incubados em banho a 37°C – 150 rpm por 2 horas. Na segunda fase entérica (iii) o pH foi ajustado para 7,2 – 7,4 utilizando solução de 1N de NaOH da primeira fase, assim como a solução de bile e pancreatina, para que as mesmas se mantivessem nas concentrações de 10 e 1 g/L. Por fim, os frascos voltaram a ser incubados a 37°C – 150 rpm durante 2 horas.

3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O tratamento dos dados foi realizado através de análise de variância multifatorial (ANOVA) e testes de comparação de média utilizando o programa Minitab 17.0 a fim de determinar a significância estatística da diferença entre as médias. As médias foram comparadas através do teste de Tukey usando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de gordura e proteína

Os resultados obtidos referentes aos teores de gordura e proteína nos leites e nas bebidas lácteas elaboradas estão descritos na Tabela 2. Os teores de gordura e proteína presentes no leite, além da sua importância nutricional, influem diretamente na qualidade dos seus derivados, contribuindo para o sabor e textura dos produtos (Caldeira *et al.*, 2010; Ricci & Domingues, 2012). A gordura possui capacidade de estabilizar o gel proteico em produtos fermentados, como iogurtes, evitando a separação do soro e conferindo maior cremosidade aos produtos (Revers *et al.*, 2016). Já o teor de proteína no leite, interfere diretamente na qualidade do gel formado durante a fermentação de iogurtes, podendo proporcionar maior firmeza ao coágulo e, conseqüentemente, ao produto final (Silva, 2015).

O teor de gordura e proteína obtido para os leites utilizados na elaboração das bebidas lácteas foi de, respectivamente, 5,43 e 3,36% para o leite de búfala e de 3,33 e 3,28% para o leite de vaca. Esse resultado se encontra abaixo do observado por Khan *et al.* (2020) ao avaliar a

composição química de leite de vaca e de búfala, observando teor de gordura e proteína de 4,10 e 3,2% para o leite bovino, ao mesmo tempo que de 6,20 e 3,40% para o leite bubalino.

Em um estudo prévio (Silva *et al.*, 2020) onde foi comparada a composição química de bebidas lácteas bubalina e bovinas, elaboradas com diferentes níveis de soro, foi observado resultados próximos também aos descritos nesse presente trabalho para as matrizes lácteas utilizadas, sendo observado teor de gordura e proteína de 5,15 e 3,53% para o leite de búfala, 3,25 e 3,21% para o leite de vaca, o que mostra uma boa padronização da matéria prima utilizada ao longo do estudo.

Caldeira *et al.* (2010), obtiveram resultados próximos ao presente trabalho no desenvolvimento de bebidas lácteas também elaboradas com leite de búfala, relatando teor de gordura e proteína de 5,80 e 4,00% para o leite bubalino. Teores superiores de gordura e proteína foram encontrados por Monteiro (2019) em seu estudo sobre a elaboração de iogurtes gregos a base de leite de búfala, observando teor de 6,47 e 4,29%, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o apresentado por Sun *et al.* (2014), que também relataram teor de 6,86% de gordura e 4,75% de proteína para o leite bubalino.

Na avaliação da composição química de leite cru, Zhu *et al.* (2015) reportou teores maiores de gordura e proteína no leite bovino, sendo eles 4,04 e 3,14%. Em contrapartida, Revers *et al.* (2015), quanto o leite de vaca utilizado para a elaboração de iogurtes, obtiveram valores inferiores ao presente estudo, com teor de 3,00% de gordura e 2,90% de proteína.

A diferença relatada pelos autores citados é justificável, uma vez que gordura e a proteína, além da sua importância, corresponde a parte mais variável da composição do leite, sendo influenciada diretamente pela raça, alimentação, região em que o animal habita e fase de lactação em que se encontra (Akgun *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2020).

Tabela 2. Quantidade de gordura e proteína das bebidas lácteas e dos leites utilizados para sua elaboração.

Bebidas lácteas/leites	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)
LB1	3,39±0,01 ^b	3,91±0,01 ^a
LB2	2,82±0,03 ^c	3,24±0,02 ^c
LV1	2,48±0,01 ^d	2,67±0,01 ^d
LV2	1,94±0,05 ^e	2,19±0,01 ^e
Leite de búfala	5,43±0,05 ^a	3,36±0,06 ^b
Leite de vaca	3,33±0,05 ^b	3,28±0,02 ^{bc}

N=3. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes. $P \leq 0,05$.

Quanto ao teor de gordura, as bebidas lácteas controle (LB1 e LV1) exibiram teor de 3,39%, para a bebida bubalina, e 2,48%, para a bebida bovina. Quando comparadas as bebidas lácteas controle, as bebidas lácteas que receberam adição de polpa de morango (LB2 e LV2) apresentaram diferença significativa ($P \leq 0,05$) no teor de gordura, com a bebida frutada bubalina exibindo teor cerca de 16% menor, enquanto a bebida frutada bovina, cerca de 21%. Esse resultado mostra que a adição do preparado de polpa de morango contribuiu para um produto com menor teor de gordura, o que já era esperado, uma vez que este corresponde a 25% da composição das bebidas frutadas (LB2 e LV2).

A adição do preparado de polpa de morango também contribuiu para um teor significativamente ($P \leq 0,05$) menor de proteína nas bebidas lácteas elaboradas (LB2 e LV2), resultando em valores de 3,24% e 2,19% para as bebidas, respectivamente, correspondendo a um teor cerca de 17% menor que as bebidas controles. As bebidas controle, por sua vez, apresentaram teor de proteína de 3,91% (LB1) e 2,67% (LV1). Esses teores condizem com os obtidos anteriormente (Silva *et al.*, 2020) quanto as bebidas lácteas contendo 25% de soro em sua composição, correspondendo a formulação controle desde trabalho, onde foram observados teores de gordura e proteína de 3,68 e 3,89% para a bebida láctea bubalina e 2,56 e 2,71% para a bebida láctea bovina.

4.2. Perfil de pós-acidificação

O perfil de pós-acidificação das bebidas lácteas probióticas adicionadas de polpa de morango pode ser observado na Tabela 3. Os resultados obtidos mostram que, de forma geral, a adição do preparado de polpa de morango resultou em produtos significativamente ($P \leq 0,05$) mais ácidos (LB2 e LV2) do que os produtos controles (LB1 e LB2) sem adição de polpa. Esse resultado já era esperado, tendo em vista que o morango é uma fruta de acidez considerável.

Todas as bebidas lácteas exibiram diferenças significativas entre o primeiro (d1) e sétimo (d7) dia de armazenamento refrigerado. A bebida láctea bubalina com polpa de morango (LB2) apresentou pH mais estável nesse período, com variação de 0,02. A bebida láctea bovina controle (LV1) apresentou o maior decréscimo (0,15) dentre os produtos.

Os resultados obtidos após 14 dias de armazenamento refrigerado, mostram aumento significativo ($P \leq 0,05$) nos valores de pH de todas as bebidas lácteas. Essa diferença ocorreu em proporções aproximadas para os produtos de uma mesma matriz, tendo as bebidas lácteas bubalinas exibido aumento de 0,19 (LB1) e 0,18 (LB2) nos valores de pH, enquanto as bebidas lácteas bovinas de 0,22 (LV1) e 0,23 (LV2). Esse comportamento também foi observado no estudo anterior e foi relatado em iogurtes por Fernandes *et al.* (2016), durante sua avaliação sobre a vida de prateleira desses produtos.

As bebidas lácteas adicionadas de polpa de fruta (LB2 e LV2) mostraram diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os valores de pH obtidos no primeiro (d1) e ao final dos 21 dias de armazenamento refrigerado (d21), o contrário foi observado quanto as bebidas lácteas controle (LB1 e LV1), cujos valores de pH nesses dias não foram significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). Embora as bebidas lácteas com polpa de morango (LB2 e LV2) tenham exibido diferenças significativas ($P \leq 0,05$) no seu pH ao final do período de análise, quando comparadas ao seus respectivos produtos controle (LB1 e LV1), pode ser observado que essa diferença foi menor nas bebidas lácteas bubalinas, com variação de 0,03 entre LB1 e LB2.

A bebida láctea bubalina adicionada de polpa de morango apresentou pH de $4,30 \pm 0,01$ ao final do armazenamento refrigerado, se mantendo estável entre o 14° e o 21° dia de análise. Esse comportamento, pode estar relacionada com o possível efeito tamponante em leites que apresentam quantidades maiores de sólidos totais, que foi relatado por Kristo et al. (2003), podendo talvez fazer com que o produto tenha maior resistência a pós-acidificação. Melo (2018), ao avaliar iogurtes elaborados com leite de búfala, relatou que os produtos produzidos com leite parcialmente desnatado apresentaram valores de pH menores do que os iogurtes produzidos com o leite de búfala integral, o que mostra que o teor de gordura pode ser um fator de grande influência nessa característica tamponante do produto.

Oliveira et al. (2015) observou em seu estudo sobre iogurtes enriquecidos com morango, valores estáveis de pH, que se mantiveram entre 4,0 e 4,6 ao longo do armazenamento.

Tabela 3. Valores de pH das bebidas lácteas obtidos em um (d1), sete (d7), catorze (d14) e vinte e um (d21) dias após a fermentação.

Bebidas Lácteas	pH			
	d1	d7	d14	d21
LB1	$4,34 \pm 0,01^{aB}$	$4,28 \pm 0,02^{aC}$	$4,47 \pm 0,01^{aA}$	$4,33 \pm 0,01^{aB}$
LB2	$4,09 \pm 0,01^{bC}$	$4,11 \pm 0,01^{cB}$	$4,29 \pm 0,01^{cA}$	$4,30 \pm 0,01^{bA}$
LV1	$4,37 \pm 0,02^{aB}$	$4,22 \pm 0,01^{bC}$	$4,44 \pm 0,01^{bA}$	$4,38 \pm 0,01^{bB}$
LV2	$4,12 \pm 0,01^{cA}$	$4,07 \pm 0,01^{dC}$	$4,30 \pm 0,01^{dA}$	$4,26 \pm 0,01^{cB}$

N=3. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha são significativamente diferentes $P \leq 0,05$.

A pós-acidificação é um fenômeno natural em produtos lácteos fermentados ocasionado pela contínua produção de ácido láctico pela cultura iniciadora *L. bulgaricus* mesmo sob refrigeração, resultando em uma possível acidificação do produto ao longo do armazenamento e sua vida de prateleira (Capuchinho, 2018; Melo, 2019). É um parâmetro importante para o controle de

qualidade de produtos lácteos fermentados dentro da indústria, pois pode ocasionar alterações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais nos produtos, comprometendo sua qualidade e podendo resultar em perdas industriais.

Além do ácido láctico, *L. bulgaricus* é capaz de produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a pós-acidificação. O H_2O_2 , aliado com a redução do pH, pode impactar na viabilidade das bactérias probióticas presentes nos produtos, sendo considerada um dos principais motivos para o decréscimo da população de *L. acidophilus* em lácteos probióticos, uma vez que este não possui catalase para hidrolisar esse composto em água e oxigênio (Mousavi *et al.*, 2019; Meybodi *et al.*, 2020).

A redução do pH durante o armazenamento pode afetar diretamente a capacidade hidrofílica da caseína, causando uma contração no coágulo e, com isso, forçando a saída do soro, sendo o principal motivo para a ocorrência de sinérese em iogurtes e bebidas lácteas (Capuchinho, 2018). Não foi observada sinérese nos produtos elaborados nessa pesquisa, os mesmos se mantiveram homogêneos durante todo o período de armazenamento, o que mostra que a pós-acidificação observada, não foi o suficiente para causar alterações físicas nas bebidas lácteas tanto adicionadas com polpa de morango quanto nas bebidas controle.

4.3. Comportamento reológico

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria quando esta é submetida a forças externas (Steffe, 1996; Gurjão *et al.*, 2015). A determinação dos parâmetros reológicos nos alimentos representa a avaliação de sua textura e estabilidade, realizada através do estudo de seu comportamento mecânico e suas variações de deformação diante de tensões sobre ele aplicadas (Bezerra, 2010). A aplicação da reologia na indústria de alimentos está diretamente relacionada ao desenvolvimento de produtos e controle de qualidade, sendo fundamental para aplicação do produto em larga escala, com a determinação de parâmetros de processo de fabricação (Barros *et al.*, 2019).

A avaliação do perfil reológico das bebidas lácteas adicionadas com polpa de morango e dos controles realizada a 5°C a partir dos modelos reológicos de Ostwald-de-Walle, Bingham e Herschel Bulkley é apresentada na Tabela 4.

As bebidas lácteas elaboradas e seus respectivos controles mostraram ajuste do R^2 superior a 0,9 para todos os modelos reológicos avaliados sob a taxa de cisalhamento de 400 1/s, sendo Herschel Bulkley o modelo ao qual as bebidas melhores se adaptaram, seguido pelo modelo Ostwald-de-Walle. Por outro lado, os ajustes mais baixos apresentados pelas bebidas lácteas foram quanto ao modelo de Bingham, mostrando que a relação existente entre a viscosidade, a tensão e a taxa de cisalhamento não são lineares, classificando as bebidas como fluídos não-Newtonianos e pseudoplásticos. Esses resultados condizem com os reportados por Mathias *et al.*

(2013) durante seu estudo sobre o comportamento reológico de iogurtes de diferentes marcas comerciais.

Os fluídos caracterizados como não-newtonianos e pseudoplásticos, são constituídos por uma suspensão de partículas flexíveis conectadas entre si, formando uma rede, e apresentando-se na forma de um gel ou emulsão com características viscoelásticas, cuja viscosidade diminui com o aumento da taxa ou tensão de cisalhamento (Steffe, 1996; Bezerra, 2010; Silva, 2017). Em outras palavras, à medida que há o aumento da tensão aplicada sob o fluído, há a diminuição da sua resistência ao escoamento. Esse efeito pode ser associado a redução das fracas interações e energia entre as moléculas que compõe a estrutura do fluído diante do aumento da deformação, resultando na diminuição da sua viscosidade (Lucey, 2002; Mathias, 2013).

Os fluidos que correspondem ao modelo de Bingham são conhecidos como plástico ideal e, geralmente, se comportam como sólidos quando se encontram em condições estáticas, sendo necessária a aplicação de uma tensão inicial para que haja o escoamento destes fluídos (Silva, 2017). A adição de soro durante o preparo das bebidas lácteas pode ter contribuído para que apresentassem o menor ajuste a esse modelo, facilitando o escoamento e influenciando nos valores baixos de tensão inicial (t_0) e viscosidade aparente (η) exibidos pelos produtos. Para tensão inicial, as bebidas lácteas probióticas mostraram variação de -0,0349 a 0,5973 (Pa) ao longo do período de armazenamento. Os produtos LB1, LB2 e LV2 não apresentaram diferença significativa ($P \geq 0,05$) para esse parâmetro ao longo dos 21 dias de refrigeração. Já a bebida láctea bovina controle (LV1), não apresentou tensão inicial (<0 (Pa)) até o final dos 21 dias de armazenamento, quando mostrou aumento desses valores, se assemelhando estatisticamente ($P \geq 0,05$) aos demais produtos. Quanto à viscosidade aparente (η), as bebidas lácteas se mantiveram estáveis durante o período analisado, com valores entre 0,0047 (LV2) e 0,0105 Pa.s (LB1), sem diferença significativa entre os produtos em d21.

Tabela 4. Parâmetros reológicos das bebidas lácteas probióticas para os modelos de Ostwald-de-Walle, Bingham e Herschel Bulkley.

Bebidas lácteas	Ostwald-de Walle			Bingham			Herschel Bulkley			
	K (Pa.s ⁰)	n	R ²	τ ₀ (Pa)	η(Pa.s)	R ²	τ ₀ (Pa)	K (Pa.s ⁰)	n	R ²
d1										
LB1	0,0652±0,02 ^{bA}	0,6770±0,04 ^{bcA}	0.9719	0,3520±0,07 ^{aA}	0,0094±0,00 ^{aB}	0.9376	0,3223±0,06 ^{aA}	0,0172±0,00 ^{bA}	0,7121±0,04 ^{bcA}	0.9720
LB2	0,1350±0,01 ^{aA}	0,5738±0,01 ^{cA}	0.9549	0,2110±0,00 ^{bA}	0,0076±0,00 ^{bA}	0.9199	0,0753±0,10 ^{abA}	0,0711±0,02 ^{aB}	0,6389±0,07 ^{cA}	0.9682
LV1	0,0035±0,00 ^{cA}	0,9952±0,15 ^{aA}	0.9529	-0,0349±0,03 ^{cB}	0,0055±0,00 ^{cA}	0.9019	0,0495±0,07 ^{bA}	0,0020±0,00 ^{cA}	0,9985±0,04 ^{aA}	0.9688
LV2	0,0147±0,00 ^{cA}	0,8255±0,03 ^{bA}	0.9899	0,1797±0,03 ^{bA}	0,0047±0,00 ^{dA}	0.9272	0,0325±0,01 ^{bAB}	0,0119±0,00 ^{bA}	0,8861±0,06 ^{abA}	0.9803
d7										
LB1	0,0812±0,03 ^{bA}	0,6623±0,05 ^{bcA}	0.9744	0,4453±0,06 ^{aA}	0,0103±0,00 ^{aAB}	0.9378	0,4270±0,07 ^{aA}	0,0226±0,01 ^{bA}	0,7053±0,01 ^{bA}	0.9780
LB2	0,1403±0,01 ^{aA}	0,5782±0,01 ^{cA}	0.9581	0,2409±0,00 ^{bA}	0,0085±0,00 ^{bA}	0.9214	0,0616±0,04 ^{bA}	0,1160±0,01 ^{aA}	0,6365±0,02 ^{cA}	0.9623
LV1	0,0073±0,00 ^{cA}	0,9699±0,10 ^{aA}	0.9460	-0,0449±0,06 ^{cB}	0,0058±0,00 ^{cA}	0.9048	0,0499±0,04 ^{bA}	0,0012±0,00 ^{cA}	1,0070±0,01 ^{aA}	0.9661
LV2	0,0240±0,00 ^{cA}	0,7484±0,01 ^{bA}	0.9900	0,2340±0,00 ^{bA}	0,0049±0,00 ^{cA}	0.9387	0,0450±0,05 ^{bA}	0,0125±0,00 ^{bA}	0,9158±0,09 ^{abA}	0.9610
d14										
LB1	0,0954±0,02 ^{aA}	0,6385±0,04 ^{cA}	0.9780	0,5487±0,12 ^{aA}	0,0103±0,00 ^{aAB}	0.9343	0,6217±0,13 ^{aA}	0,0278±0,00 ^{bA}	0,6761±0,09 ^{bA}	0.9664
LB2	0,1393±0,01 ^{bA}	0,5703±0,01 ^{cA}	0.9601	0,2712±0,00 ^{bA}	0,0078±0,00 ^{bA}	0.9243	0,0973±0,10 ^{bA}	0,0885±0,02 ^{aAB}	0,5880±0,34 ^{cA}	0.9550
LV1	0,0056±0,00 ^{cA}	0,9933±0,03 ^{aA}	0.9434	-0,0403±0,03 ^{cB}	0,0060±0,00 ^{cA}	0.9064	0,0395±0,09 ^{bA}	0,0014±0,00 ^{cA}	1,0105±0,12 ^{aA}	0.9697
LV2	0,0195±0,01 ^{cA}	0,7936±0,07 ^{bA}	0.9802	0,2470±0,06 ^{bA}	0,0048±0,00 ^{dA}	0.9299	0,0425±0,02 ^{bb}	0,0131±0,00 ^{cA}	0,9538±0,01 ^{aA}	0.9696
d21										
LB1	0,1076±0,01 ^{aA}	0,6127±0,02 ^{bA}	0.9789	0,5973±0,13 ^{aA}	0,0105±0,00 ^{aA}	0.9375	0,5083±0,15 ^{aA}	0,0279±0,00 ^{bA}	0,6685±0,00 ^{bA}	0.9802
LB2	0,1390±0,00 ^{aA}	0,5695±0,00 ^{bA}	0.9739	0,3320±0,56 ^{aA}	0,0056±0,00 ^{aA}	0.9183	0,0588±0,01 ^{bA}	0,0973±0,01 ^{aA}	0,5284±0,02 ^{cA}	0.9626
LV1	0,0270±0,04 ^{bA}	0,9169±0,21 ^{aA}	0.9445	0,1056±0,47 ^{aA}	0,0070±0,00 ^{aA}	0.9272	0,0499±0,07 ^{bA}	0,0017±0,00 ^{cA}	0,9688±0,00 ^{aA}	0.9745
LV2	0,0246±0,01 ^{bA}	0,7629±0,06 ^{abA}	0.9704	0,2993±0,09 ^{aA}	0,0049±0,00 ^{aA}	0.9318	0,0355±0,02 ^{bb}	0,0151±0,00 ^{bA}	0,8812±0,07 ^{aA}	0.9784

N=3. Onde: LB1: bebida láctea bubalina controle; LB2: bebida lácteas bubalina sabor morango; LV1: bebida láctea bovina controle; LV2 bebida láctea bovina sabor morango; d1, d7, d14 e d21: 1, 7, 14 e 21 dias após a fermentação. τ₀: Tensão inicial ou limite de escoamento (Pa); η: Viscosidade aparente (Pa.s); K: Índice de consistência (Pa.s⁰); n: Índice de fluxo ou escoamento; R²: Coeficiente de determinação. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna mostram diferença significativa entre as bebidas em um mesmo dia de análise. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna mostram diferença significativa para a mesma bebida ao longo do armazenamento refrigerado. $P \leq 0,05$.

As bebidas que receberam adição da polpa de morango apresentaram índice de consistência mais estável, enquanto os controles mostraram aumento dos valores durante o armazenamento refrigerado. Esse aumento da consistência pode estar relacionado com o fortalecimento das ligações proteína-proteína, que compõe a estrutura das bebidas lácteas, que ocorre entre as caseínas enquanto o produto se encontra em repouso (Damin *et al.*, 2008; Santo *et al.*, 2012). Por outro lado, a adição da polpa de morango pode ter contribuído para maior estabilidade das bebidas frutadas durante o armazenamento, uma vez que o morango possui pectina em sua composição e esta é capaz de interagir com a superfície das micelas de caseína, proporcionando maior estabilidade a estrutura (Everett & McLeod, 2005; Islam, Monalisa & Hoque, 2012; Santo *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos pelo índice de fluxo ou escoamento através do modelo de Ostwald-de-Walle é o que diferencia o comportamento dos fluídos, de modo que quando n é menor que 1 (para valores entre 0 e 1), o fluido se comportará como pseudoplástico (Bezerra, 2010; Silva, 2017), correspondendo ao comportamento exibido pelas bebidas lácteas elaboradas no presente estudo. As bebidas lácteas bubalinas apresentaram menor índice de fluxo quando comparadas às bebidas bovinas, exibindo valores de 0,6770 (LB1) e 0,5738 (LB2) após 24 horas de refrigeração, ao mesmo tempo em que LV1 e LV2, obtiveram 0,9952 e 0,8255, respectivamente. O comportamento pseudoplástico influi nos parâmetros de produção industrial dos produtos, permitindo uma homogeneização mais completa e intensa na fase de mistura e atuando na velocidade de fluxo mediante ao estreitamento de tubos, que ocorre durante o processo de envase (Bezerra, 2010, Barros *et al.*, 2019).

O modelo reológico de Herschel Bulkley é considerado uma extensão do modelo de Ostwald-de-Walle, pois, assim como este, considera a variação de viscosidade e a relação não linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento, sendo ambos indicados como os modelos mais satisfatórios para o estudo do comportamento reológico de iogurtes e bebidas lácteas (Bezerra, 2010; Mathias *et al.*, 2013). A diferença está que o modelo reológico de Herschel Bulkley compreende a tensão limite de escoamento (τ_0) do fluído, um importante parâmetro para o processamento desse tipo de produto que representa a menor tensão necessária para o seu escoamento (Steffe, 1996; Mathias, 2013; Recchia, 2014).

Para o índice de consistência (k) e índice de fluxo (n), os resultados obtidos mostraram comportamentos semelhantes aos avaliados pelo modelo de Ostwald-de-Walle, até mesmo pela conformidade dos modelos reológicos quanto a esses parâmetros. As bebidas lácteas elaboradas a partir de leite de búfala (LB1 e LB2) exibiram índice de consistência mais elevado do que os produtos bovino (LV1 e LV2), tendo as bebidas lácteas frutadas apresentado consistência superior do que seu controle sem fruta. A bebida láctea bubalina (LB2) foi a única a apresentar diferença

significativa ($P \leq 0,05$) dos valores do índice de consistência ao durante o período refrigerado, expressando o aumento de 0,0262 Pa.s⁹ entre o primeiro e último dia de armazenamento. O índice de fluxo ou escoamento mostrou que as bebidas lácteas bovinas apresentam menor pseudoplásticidade, tendo a bebida controle (LV1) exibido um comportamento dilatante entre 7 e 14 dias de análise, porém sem diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre os demais dias. Para a tensão de limite de escoamento, a bebida láctea bubalina controle (LB1) apresentou valores mais elevados durante a refrigeração, seguido da bebida bubalina frutada (LB2). Esse comportamento difere do relatado por Mathias et al. (2013) que relacionou o maior limite de escoamento com o índice de consistência mais alto de iogurtes comerciais. Embora todas as bebidas lácteas tenham apresentado variação do limite de escoamento entre o primeiro e último dia de armazenamento, está se mostrou significativa somente para a bebida láctea bovina (LV2), cujos valores oscilaram entre 0,0325 Pa (d1), 0,0450 Pa (d7), 0,0425 Pa (d14) e 0,0355 Pa (d21).

Todas as bebidas lácteas apresentaram tixotropia, tendo curvas ascendentes com um comportamento pseudoplástico, ao mesmo tempo em que as curvas descendentes apresentaram comportamento dilatante (Figura 2). O comportamento tixotrópico é típico de produtos que apresentam pseudoplásticidade e muito comum em produtos lácteos, em especial iogurtes, bebidas lácteas e leites fermentados, para os quais a tixotropia foi relatada em outros estudos (Paseephol, 2008; Gomes & Penna, 2009; Mathias, 2013; Recchia, 2014; Silva, 2015; Silva, 2017).

A presença de tixotropia indica que a viscosidade do produto diminui conforme uma força ou tensão de cisalhamento constante é aplicada sobre ele, causando uma deformação temporária em sua estrutura, que se reestabelece após essa força ser retirada (Steffe, 1996; Mathias, 2013; Recchia, 2014). Essa deformação é um fenômeno conhecido como histerese, que é representada pela área entre as curvas ascendentes e descendentes no tixograma, onde quanto maior a distância entre as curvas, maior a histerese e, conseqüentemente, maior o efeito tixotrópico (Holdsworth, 1993). A histerese compreende a medida da extensão da quebra estrutural do produto em resposta a tensão de cisalhamento, o que ocorre através da separação das partículas que compõe o fluido quando uma força é aplicada, causando a quebra da estrutura e facilitando o seu escoamento. Quando em repouso, as ligações entre as partículas separadas voltam a se fortalecer e a estrutura do fluido se reestabelece (Recchia, 2014; Silva, 2017).

As bebidas elaboradas a partir do leite de búfala (LB1 e LB2), apresentaram um comportamento tixotrópico mais evidente, podendo estar relacionado com a consistência mais elevada desses produtos, o que proporcionaria uma deformação mais significativa da estrutura das bebidas (Mathias, 2013). A adição do preparado de polpa de morango às bebidas lácteas aumentou a histerese nos produtos, podendo ser observada pela diferença da distância entre as curvas do

tixograma quanto às bebidas lácteas frutadas e seus respectivos controles, elevando, por consequência, sua consistência e viscosidade (Figura 2). Considerando a importância desses parâmetros de qualidade para produtos lácteos, que influem diretamente na aceitabilidade do produto frente aos consumidores, a adição de polpa de morango causou um efeito benéfico nas bebidas lácteas elaboradas.

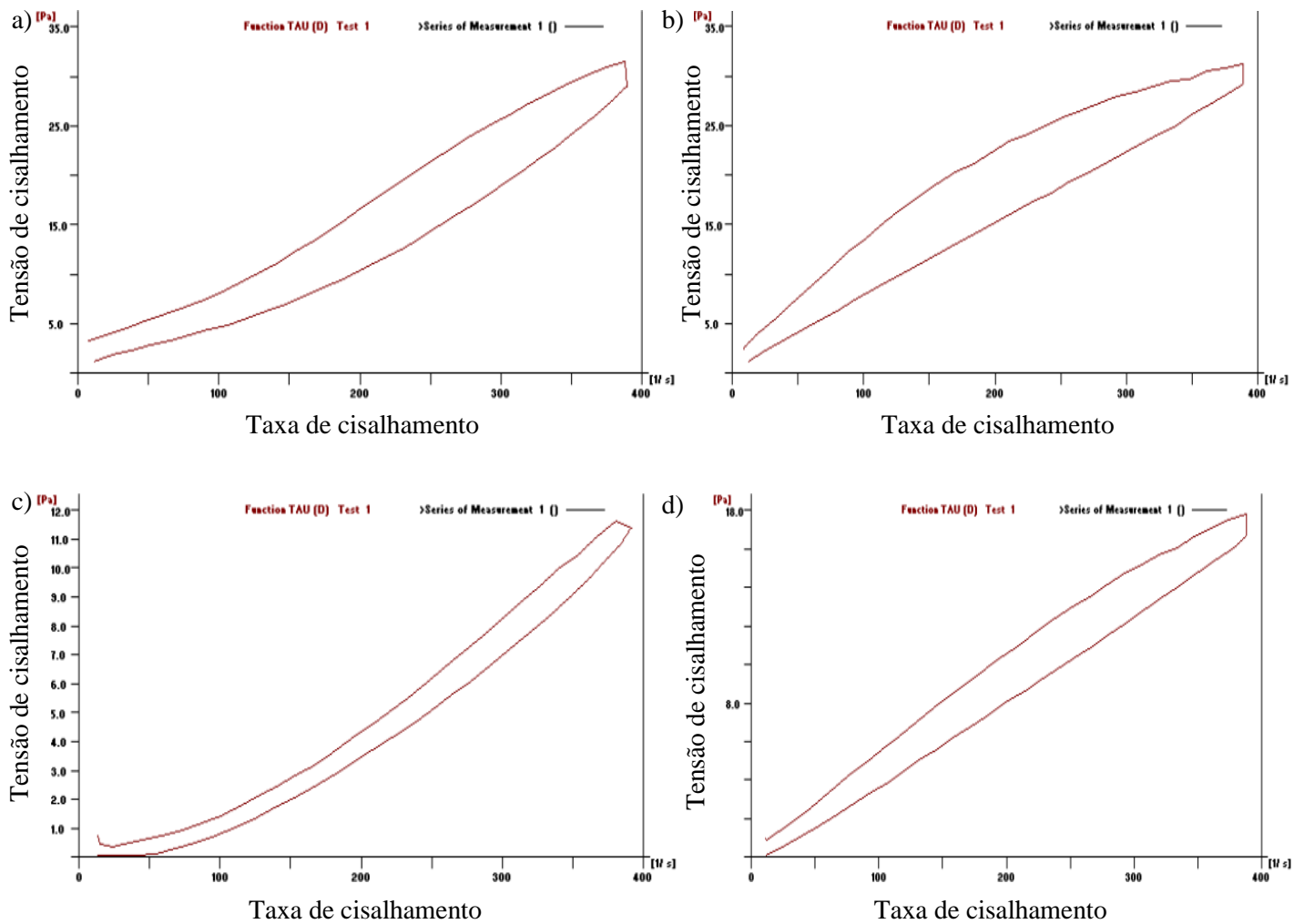


Figura 2. Tixograma das bebidas lácteas e seus controles, após 7 dias de armazenamento a 4°C. Onde: a) bebida láctea bubalina controle (LB1); b) bebida láctea bubalina com polpa de morango (LB2); c) bebida láctea bovina controle (LV1); b) bebida láctea bovina com polpa de morango (LV2).

4.4. Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos das bebidas lácteas adicionadas com polpa de morango, das bebidas controle e dos leites utilizados na elaboração dos produtos, foi analisado e está apresentado na Tabela 5.

A composição lipídica do leite constitui em um dos componentes de maior importância nutricional e tecnológica de seus derivados, interferindo diretamente em seu rendimento, textura, cor e sabor (Caldeira *et al.*, 2010; Pecová *et al.*, 2019). A porção lipídica do leite é formada por triglicerídeos, que se apresentam em suspensão na forma de glóbulos na fase aquosa do leite, onde permanecem em uma emulsão estável (Kowaleski, 2018).

A síntese ou a secreção dos ácidos graxos no leite pode ocorrer de formas distintas. Cerca de 40% do teor de ácido palmítico secretado no leite, bem como os ácidos graxos compostos por mais de 18 átomos de carbono, são obtidos pré-formados através dos nutrientes presentes no sangue e nas reservas corporais do animal. Já os demais ácidos graxos de cadeia curta (4) e cadeia média (16) são sintetizados pela glândula mamária dos ruminantes utilizando b-hidroxibutirato. Assim, a composição de ácidos graxos no leite varia de acordo com a dieta, principalmente os nutrientes que nela constituem, o ambiente e fase de lactação do animal (Caldeira *et al.*, 2010).

De forma geral, ácidos graxos podem conter na composição de sua cadeia de 2 a 30 átomos de carbono, podendo apresentar ou não duplas ligações. Os ácidos graxos podem, também serem classificados de acordo com o número de dupla ligações que apresentam em suas cadeias, sendo chamados de saturados, os ácidos graxos que não apresentam dupla ligações, insaturados, quando apresentam dupla ligação (Kowaleski, 2018). Também, de acordo com Kowaleski (2018), os ácidos graxos insaturados ainda podem ser divididos em monoinsaturados, quando possuem uma única dupla ligação, e poli-insaturados, quando possuem mais de uma ligação dupla ao longo de sua cadeia de carbonos.

Os ácidos graxos de cadeia curta correspondem aos ácidos graxos saturados que possuem de 4 a 10 (C:4 – C:10) carbonos em sua composição. Os resultados obtidos quanto aos ácidos graxos de cadeia curta analisados, (C:8) caprílico e (C:10) cáprico, foram, respectivamente, de 0,83 e 1,56% no leite de búfala e de 1,33 e 3,22%, no leite de vaca, ambos apresentando diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as matrizes lácteas (Tabela 4). Esses resultados se mostram próximos do que os relatados por outros estudos, como Caldeira *et al.* (2010), observou o teor de C:8 e C:10 em leite de búfala variar, respectivamente, de 0,48 e 0,92% até 0,41 e 0,75% entre o início e o final da lactação. Da mesma forma, Lopes *et al.* (2011), ao avaliar o perfil lipídico do leite de vacas alimentadas com diferentes pastagens e suplementação alimentar, obtiveram um teor médio de 0,94% de C:8 e 2,22% para C:10.

As bebidas lácteas controle permitem que seja observado as possíveis alterações no perfil de ácido de graxo das matrizes lácteas após a fermentação. Para os teores de ácido graxos de cadeia

curta, ambas as bebidas lácteas controle (LB1 e LV1) apresentaram diferenças, embora não significativas ($P \geq 0,05$), quando comparadas aos leites utilizados para sua fermentação. Enquanto a bebida láctea bubalina controle (LB1) apresentou teores de 0,72 e 1,43% para C:8 e C:10, respectivamente, a bebida láctea bovina controle (LV1) exibiu um teor de 1,34 e 3,35% para os mesmos ácidos graxos. Esses valores se mantiveram estáveis nas bebidas lácteas controle ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado, sem apresentar diferença significativa entre o primeiro (d1) e o último (d21) dia de análise. Khan et al. (2020), ao compararem o perfil de ácido graxo de iogurtes elaborados com leite de búfala e de vaca, relataram teores de 2,63% (C:8) e 4,15% (C:10) para os iogurtes bubalinos, e de 1,51% (C:8) e 3,11% (C:10) para os iogurtes bovinos.

Os resultados obtidos quanto aos teores dos ácidos graxos de cadeia curta C:8 e C:10 nas bebidas lácteas adicionadas do preparado de polpa de morango (LB2 e LV2) foram, respectivamente, 0,79 e 1,56% para as bebidas lácteas bubalinas e 1,26 e 3,18% para as bebidas bovinas. Com exceção do teor de 3,18% de ácido caprílico (C:10) exibido pela bebida láctea LV2, as bebidas lácteas elaboradas não apresentaram diferenças significativas com relação aos seus controles ($P \geq 0,05$). Da mesma forma, os teores de C:8 e C:10 se mantiveram sem alterações consideráveis ($P \geq 0,05$) ao longo dos 21 dias de análise.

Os ácidos graxos de cadeia média são aqueles que possuem de 12 a 16 carbonos em sua cadeia (C:12 – C:16). Ácidos graxos saturados de cadeia média, em especial ácido láurico (C:12), mirístico (C:14) e palmítico (C:16) e são associados ao efeito hipercolesterolêmico do leite e de seus derivados, proporcionando o aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa intensidade (LDL colesterol) no sangue humano (Oliveira *et al.*, 2009; Caldeira *et al.*, 2010; Dibbern, 2014). Os resultados obtidos quanto aos teores de ácidos graxos saturados de cadeia média nos leites utilizados na elaboração dos produtos foram de 2,37% (C:12), 13,75% (C:14) e 42,47% (C:16), para o leite de búfala, e 4,03% (C:12), 12,79% (C:14) e 39,76% (C:16), para o leite de vaca, tendo o teor de ácido mirístico (C:14) não apresentado diferença estatística entre as matrizes ($P \geq 0,05$). O ácido palmítico (C:16) é o ácido graxo de maior importância quantitativa no leite, equivalendo a cerca de 30% do total de ácidos graxos, seguido do ácido mirístico que representa cerca de 11% dos ácidos graxos encontrados no leite (Mansson, 2008).

As bebidas lácteas controle elaboradas a partir de leite de búfala (LB1) exibiram redução significativa ($P \leq 0,05$) de 0,16% e 0,93% nos teores de ácido láurico (C:12) e ácido mirístico (C:16), respectivamente, após a fermentação. Ambos, assim como o ácido palmítico (C:14), se mantiveram sem alterações significativas ($P \geq 0,05$) ao final de 21 dias de armazenamento. Já os produtos controle elaborados com leite de vaca (LV1), não apresentaram diferença significativa nos teores dos ácidos graxos (C:12, C:14 e C:16) quando comparados com o leite e, da mesma forma, não apresentaram variação estatística ao longo do período de análise. Os resultados relatados por Khan et al. (2020) para o teor de ácidos graxos saturados de cadeia média (C:12, C:14 e C:16) em iogurtes elaborados com leite de búfala foram, respectivamente, de 5,05, 9,66 e

26,29%, enquanto em iogurtes elaborados com leite de vaca, o teor foi de 3,98, 11,29 e 27,53%. A adição de polpa de morango na elaboração das bebidas lácteas LB2 e LV2 não alteraram estatisticamente ($P \geq 0,05$) os teores dos ácidos graxos de cadeia média analisados. As bebidas lácteas frutadas bubalinas apresentaram o teor de 2,34% (C:12), 13,66% (C:14) e 41,30% (C:16), ao mesmo tempo que as bebidas bovinas o teor de 3,98% (C:12), 12,99% (C:14) e 38,34% (C:16). Em ambas as bebidas lácteas (LB2 e LV2), os teores de ácido láurico (C:12), mirístico (C:14) e palmítico (C:16) se mantiveram estáveis ao longo de 21 dias de armazenamento.

Os ácidos graxos de cadeia longa correspondem ao grupo de ácidos graxos que possuem 18 átomos de carbono ou mais em sua cadeia. Dentro desse mesmo grupo, encontramos os ácidos graxos polinsaturados da família ômega 9 (n-9), ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3), os quais possuem insaturações que se iniciam, respectivamente, no nono, sexto ou terceiro carbono da cadeia (Martin *et al.*, 2006; Pappiani, 2016; Kowaleski, 2018). Esses ácidos graxos desempenham papel essencial no organismo humano, atuando na manutenção das membranas celulares e das funções cerebrais, auxiliando na troca de oxigênio atmosférico no plasma sanguíneo, tendo seu consumo associado a efeitos anti-inflamatório, antioxidante, hipotensor, hipocolesterolêmico, com a diminuição dos níveis de LDL do sangue, bem como, a melhora a sensibilidade à insulina e a redução de incidência de doenças crônicas (Caldeira *et al.*, 2010; Pappiani, 2016; Kowaleski, 2018; Rotta *et al.*, 2020).

Tanto nos leites quanto nas bebidas lácteas elaboradas a partir deles, foi analisado o teor do ácido oleico (C:18:1, n-9), ácido linoleico (C:18:2, n-6), ácido linoleico conjugado (C:18:2, CLA) e ácido linolênico (C:18:3, n-3). O leite de búfala apresentou teores maiores de ácido oleico e linolênico (32,48 e 1,38%) quando comparado ao leite de vaca (31,73 e 0,45%), porém essa diferença não foi significativa ($P \geq 0,05$). Quanto ao teor do ácido linoleico, o leite de vaca exibiu um teor 1,61% maior que o leite de búfala ($P \leq 0,05$). Os resultados obtidos para o leite bovino se mostraram superiores aos relatados por Lopes *et al.* (2011), que descreveram obtiveram teores médios de 23,95% para C:18:1, 1,07% para C:18:2 e 0,49% para C:18:3. Teores inferiores de ácidos graxos de cadeia longa também foram observados por Caldeira *et al.* (2010), porém quanto ao leite bubalino, para o qual relataram teores médios 24,48% para C:18:1, 0,80% para C:18:2 e 0,56% para C:18:3.

Tabela 5. Perfil de ácido graxo das bebidas lácteas probióticas elaboradas a partir de leite de búfala e de vaca.

Ácidos graxos	Leites		Bebidas lácteas bubalinas				Bebidas lácteas bovinas			
	LB	LV	LB1 d1	LB1 d21	LB2 d1	LB2 d21	LV1 d1	LV1 d21	LV2 d1	LV2 d21
C8:0 ácido caprílico	0,83±0,02 ^b	1,33±0,19 ^a	0,72±0,02 ^b	0,75±0,01 ^b	0,79±0,01 ^b	0,77±0,03 ^b	1,34±0,02 ^a	1,33±0,01 ^a	1,26±0,01 ^a	1,31±0,02 ^a
C10:0 ácido cáprico	1,56±0,03 ^c	3,22±0,06 ^{ab}	1,43±0,01 ^c	1,46±0,01 ^c	1,56±0,00 ^c	1,55±0,07 ^c	3,35±0,04 ^a	3,37±0,03 ^a	3,18±0,02 ^b	3,30±0,02 ^{ab}
C12:0 ácido laurico	2,37±0,04 ^c	4,03±0,00 ^{ab}	2,21±0,03 ^d	2,28±0,03 ^{cd}	2,34±0,03 ^{cd}	2,37±0,08 ^c	4,11±0,03 ^{ab}	4,17±0,02 ^a	3,98±0,03 ^b	4,07±0,01 ^{ab}
C14:0 ácido mirístico	13,75±0,17 ^a	12,79±0,64 ^a	12,82±0,19 ^a	13,12±0,15 ^a	13,66±0,16 ^a	13,74±0,38 ^a	13,20±0,12 ^a	13,38±0,01 ^a	12,99±0,12 ^a	13,22±0,02 ^a
C16:0 ácido palmítico	42,47±0,73 ^a	39,76±1,01 ^{cd}	39,63±1,17 ^{bc}	40,44±0,03 ^{ab}	41,30±1,07 ^{ab}	41,60±0,38 ^{ab}	38,16±0,07 ^d	38,32±0,11 ^d	38,34±0,25 ^d	38,25±0,08 ^d
C16:1 ácido palmitoleico	1,57±0,00 ^a	2,27±0,01 ^a	2,81±0,74 ^a	2,25±0,00 ^a	1,96±0,53 ^a	1,89±0,33 ^a	2,28±0,44 ^a	2,58±0,04 ^a	2,29±0,41 ^a	2,17±0,00 ^a
C18:1 do ácido oleico (n-9)	32,48±0,32 ^{bc}	31,73±0,28 ^c	34,19±0,45 ^a	33,59±0,22 ^{ab}	32,69±0,13 ^{bc}	32,46±0,06 ^{bc}	32,47±0,15 ^{bc}	31,81±0,29 ^{bc}	32,87±0,24 ^{abc}	32,64±0,03 ^{bc}
C18:2 ácido linoleico (n-6)	2,00±0,27 ^b	3,61±0,37 ^a	1,81±0,21 ^b	1,82±0,01 ^b	1,79±0,34 ^b	1,75±0,29 ^b	3,56±0,03 ^a	3,52±0,08 ^a	3,57±0,04 ^a	3,53±0,01 ^a
C18:2 CLA	1,59±0,09 ^b	0,81±0,12 ^d	1,68±0,14 ^a	1,63±0,05 ^{ab}	1,64±0,09 ^{ab}	1,59±0,06 ^b	0,98±0,11 ^c	0,95±0,08 ^{cd}	0,96±0,02 ^c	0,94±0,00 ^{cd}
C18:3 ácido linolênico (n-3)	1,38±1,04 ^{ab}	0,45±0,02 ^b	2,70±0,03 ^a	2,66±0,01 ^a	2,27±0,28 ^a	2,28±0,28 ^a	0,55±0,01 ^b	0,57±0,02 ^b	0,56±0,01 ^b	0,57±0,00 ^b

N=3. Onde: LB: leite de búfala; LV: leite de vaca; LB1: bebida láctea bubalina controle; LB2: bebida láctea bubalina sabor morango; LV1: bebida láctea bovina controle; LV2 bebida láctea bovina sabor morango; d1: produto 1 dia após a fermentação; d21: produto 21 dias após a fermentação; n-9: ômega 9; n-6: ômega 6; n-3: ômega 3; CLA: Ácido linoleico conjugado. Letras diferentes em uma mesma linha são significativamente diferentes. $P \leq 0,05$.

As bebidas lácteas controle (LB1 e LV1) apresentaram alterações nos teores dos ácidos graxos de cadeia longa analisados com relação aos leites utilizados na fermentação. O teor de ácido oleico (C:18:1) nas bebidas lácteas bubalinas (LB1) foi o único dos ácidos graxos de cadeia longa a apresentar aumento considerável ($P \leq 0,05$) após a fermentação e preparo das bebidas, exibindo teor de 34,19%. Também pode ser observado acréscimo do teor do ácido linolênico (C:18:3) nas bebidas controle bubalina e bovina, porém essa diferença não foi significativa ($P \geq 0,05$). Já com relação ao teor de ácido linoleico (C:18:2) nas bebidas lácteas controle, esse mostrou uma redução não significativa quando comparado ao teor exibido pelos leites ($P \geq 0,05$). Essa queda pode ser resultante do processo de fermentação, onde alguns ácidos graxos podem sofrer decomposição (Kowaleski, 2018).

O teor dos ácidos graxos analisados (C:18:1, C:18:2 e C:18:3) nas bebidas lácteas frutadas (LB2 e LV2) apresentaram diferença quanto as bebidas controle, porém, essa diferença não se mostrou significativa ($P \geq 0,89^{*+},05$).

Esse resultado já era esperado devido à incorporação do preparado de morango às bebidas durante sua preparação. Ao final dos 21 dias de armazenamento refrigerado, tanto as bebidas lácteas controle quando as bebidas adicionadas de polpa de morango, não exibiram alterações significativas ($P \geq 0,05$) quanto ao teor dos ácidos oleico, linoleico e linolênico, resultando, respectivamente, em um teor de 33,59%, 1,82% e 1,66% para LB1, de 32,79%, 1,75% e 2,28% para LB2, de 31,51%, 3,52% e 0,57% para LV1 e de 32,64%, 3,53% e 0,56% para LV2.

Em sua avaliação sobre o perfil de ácido graxo em iogurtes elaborados com leite de vaca e de búfala, Khan et al. (2020), obtiveram teores menores do que o obtido no presente trabalho para os ácidos oleico e linoleico, tendo o iogurte bubalino apresentado um teor de 26,48% (C:18:1) e 0,45% (C:18:2), enquanto o iogurte bovino de 21,77% (C:18:1) e 0,31% (C:18:2). Os teores iniciais relatados pelos autores para estes ácidos graxos, se mostraram menos estáveis ao longo do período de análise, mostrando decréscimos significativos ao final de 20 dias de armazenamento refrigerado.

O ácido linoleico conjugado (CLA) é um ácido graxo de cadeia longa que pode ser encontrado naturalmente na gordura da carne e do leite de animais ruminantes, sendo produzida pelas bactérias presentes no intestino destes animais, através da isomerização enzimática do ácido linoleico (Kowaleski, 2018). A presença de CLA em leite e em derivados desperta grande interesse de pesquisadores que, cada vez mais, associam seu consumo a efeitos benéficos a saúde, apresentando propriedades anticarcinogênicas, com a inibição do crescimento tumoral e proliferação celular, atuando na modulação da imunidade, diminuindo processos inflamatórios e influenciando na produção de anticorpos, atuando no controle de diabetes, bem como no controle da gordura corporal, através do aprimoramento do gasto energético e da redução da disposição de gorduras (Lopes, 2011; Milani *et al.*, 2016; Kowaleski, 2018).

Os teores de CLA obtido para os leites foram de 1,59% para o leite de búfala e 0,81% para o leite de vaca. Esses resultados condizem com o relatado pela literatura, onde o leite bubalino, quando comparado com o bovino, pode apresentar quase o dobro de CLA (Pignata *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2015).

Tanto as bebidas lácteas controle de leite de búfala (LB1) quanto as bebidas controle de leite de vaca (LV1), apresentaram aumento no teor de CLA com relação aos leites com os quais foram elaboradas, tendo LB1 exibido teor de 1,68% e LV1 de 0,98%. Após 21 dias de armazenamento refrigerado, o teor de CLA apresentou uma redução não significativa ($P \geq 0,05$), encerrando o período de análise com 1,63% para a bebida controle bubalina e 0,93% para a bebida controle bovina. O mesmo comportamento foi observado quanto as bebidas adicionadas de polpa de morango (LB2 e LV2), que expressaram redução do seu teor de CLA ao longo do armazenamento, passando de 1,64 para 1,59% (LB2) e de 0,96 para 0,94% (LV2). Yadav *et al.* (2007) também relataram aumento dos níveis de CLA em iogurtes após a fermentação com diferentes lactobacilos, mas, ao contrário deste presente trabalho, o teor de CLA continuou aumentando ao longo do armazenamento.

Além do teor inicial de CLA no leite, outros fatores podem influenciar o teor de CLA nos produtos lácteos fermentados, como a atividade enzimática das culturas fermentadoras e sua interação com o meio ao longo do seu crescimento durante a fermentação (Milani *et al.*, 2016). Algumas cepas de *Lactobacillus acidophilus* são capazes de produzir CLA durante a fermentação devido à alta capacidade de produção da enzima ácido linoleico isomerase (Milani *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2007).

4.5. Enumeração de bactérias viáveis

A população das culturas fermentadoras, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, foi avaliada nas bebidas lácteas ao longo dos 21 dias de armazenamento refrigerado. A Figura 1 mostra a contagem do número de bactérias viáveis durante esse período.

A população de *S. thermophilus* mostrou maior estabilidade na bebida láctea bubalina controle (LB1), não apresentando diferenças significativas ($P \geq 0,05$) de sua população ao longo do período de armazenamento refrigerado. A adição de polpa de morango contribuiu para a redução significativa ($P \leq 0,05$) da população de *S. thermophilus* entre o 1° e 21° dia de análise, tendo a bebida láctea bubalina (LB2) exibido menor alteração, com a diminuição de 0,26 log UFC/mL, enquanto a bebida bovina (LV2), 0,62 log UFC/mL.

A viabilidade de *L. bulgaricus* em lácteos fermentados pode ser afetada através de diferentes fatores que vão desde sua alta suscetibilidade a acidez do meio, que tende a aumentar ao longo de sua vida de prateleira, até sua sensibilidade a presença de oxigênio, que pode ser incorporado ao

produto durante o seu preparo em etapas específicas, como na adição de frutas (Oliveira *et al.*, 2015; Ertem & Çakmakçi, 2017; Silva *et al.*, 2020). Todas as bebidas lácteas exibiram diminuição gradativa na população de *L. bulgaricus* ao longo do período de armazenamento refrigerado. Essa redução na viabilidade da bactéria, foi menos expressiva na bebida láctea bubalina com polpa de morango (LB2) e seu controle (LB1), que apresentaram população de *L. bulgaricus* cerca de 12% maior que os produtos bovinos ao final dos 21 dias de armazenamento refrigerado. Isso pode estar relacionado com o maior teor de gordura nos produtos LB1 e LB2 já observados neste trabalho. A gordura presente no produto, por sua vez, pode estar exercendo um efeito protetivo às bactérias, influenciando de forma benéfica na sua resistência durante o armazenamento (Silva, *et al.* 2020).

Os resultados obtidos se encontram em conformidade com o relatado por Oliveira *et al.* (2015), que, em seu estudo sobre o efeito da incorporação de morango em iogurtes, também observaram redução na viabilidade, de *S. thermophilus* a partir do 7º dia de análise, e de *L. bulgaricus*, ao longo do armazenamento refrigerado.

A viabilidade do probiótico *L. acidophilus*, foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) na bebida láctea controle bubalina, que exibiu população de $7,84 \pm 0,01$ (LB1) e $7,43 \pm 0,05$ log UFC/mL em d21, ao mesmo tempo em que a bebida láctea controle bovina apresentou população de $7,00 \pm 0,01$ e $6,70 \pm 0,04$ log UFC/mL, no mesmo período de análise. A adição de polpa de morango não resultou em diferenças significativas ($P \geq 0,05$) na viabilidade de *L. acidophilus* na bebida láctea bubalina com relação ao seu controle. Já a bebida láctea bovina com adição de polpa de morango, apresentou redução significativa ($P \leq 0,05$) a partir do 14º dia de armazenamento refrigerado (d14).

Em um estudo anterior (Silva *et al.*, 2020), onde foi avaliado o efeito do uso de diferente quantidade de soro na elaboração de bebidas lácteas bubalina e bovina, quanto a viabilidade de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, foi relatado o efeito protetor das culturas fermentadoras causado, possivelmente, pela gordura presente nos produtos. Uma vez que as bebidas lácteas bubalinas (LB1 e LB2) apresentaram maior teor de gordura quando comparadas as bebidas bovinas, essa possibilidade é reforçada, assim como demonstra vantagens no uso do leite de búfala para elaboração de lácteos fermentados probióticos.

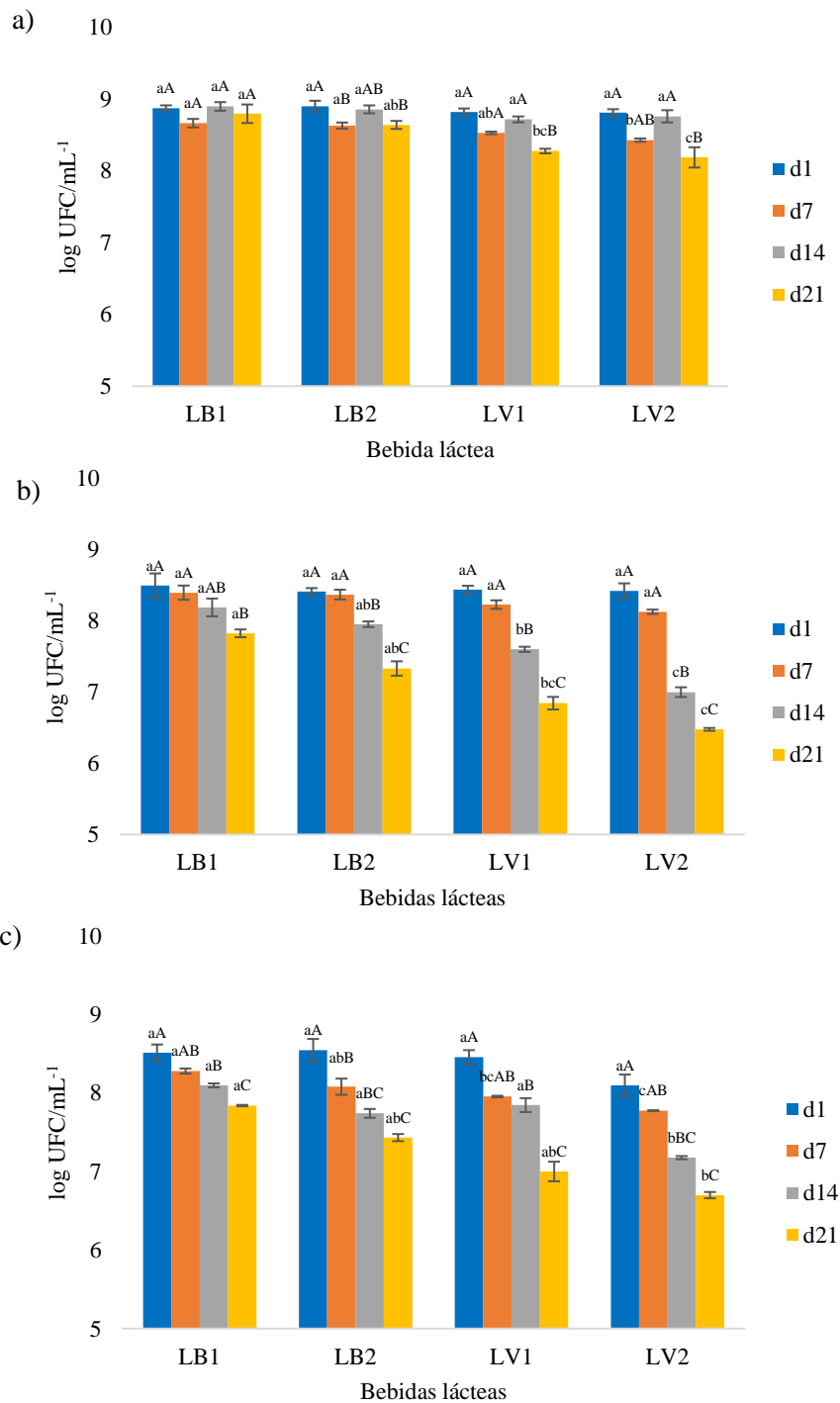


Figura 3. Contagem do número de bactérias viáveis em bebidas lácteas ao longo de 21 dias de armazenamento refrigerado 4°C. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*. LB1) bebida láctea bubalina controle; LB2) bebida láctea bubalina adicionada de polpa de morango; LV1) bebida láctea bovina controle; LV2) bebida láctea bovina adicionada de polpa de morango. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as bebidas lácteas em um mesmo dia. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) do mesmo produto ao longo do período de análise. N=4.

4.6. Avaliação do estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático

As culturas fermentadoras *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, foram avaliadas quanto a sua capacidade de sobrevivência através da simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*. O ensaio foi realizado em três fases, onde: Fase 1 (gástrica); Fase 2 (entérica 1); Fase 3 (entérica 2), sendo a viabilidade dos micro-organismos avaliada ao final de cada fase nos tempos de 2, 4 e 6 horas. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 4.

A população inicial (F0) obtida para *S. thermophilus* (Figura 4a), avaliada antes do início da simulação ao estresse gastrointestinal *in vitro*, foi cerca de 10^9 UFC/mL, variando de 8,52 log UFC/mL (LV2) a 8,88 log UFC/mL (LB1), apresentando redução gradativa e significativa ($P \leq 0,05$) em todas as bebidas lácteas ao longo do ensaio. Ao final da fase 1 (F1), as bebidas lácteas bovinas (LV1 e LV2) exibiram redução mais expressiva da viabilidade de *S. thermophilus* quando comparadas as bebidas elaboradas com leite de búfala (LB1 e LB2), diminuindo cerca de 2 e 3 logs UFC/mL, respectivamente para as bebidas bovinas e bubalinas. Após a fase 2 (F2), é possível observar outra queda significativa ($P \leq 0,05$) na população de *S. thermophilus*, que se encontrou entre 10^3 UFC/mL (LV1 e LV2) e 10^5 UFC/mL (LB1 e LB2). Após a fase 3 do ensaio, não foi possível avaliar a sobrevivência de *S. thermophilus* nas bebidas lácteas bovinas, no entanto, a bactéria ainda se mostrou viável nos produtos elaborados com leite de búfala, apresentando população de 4,40 log UFC/mL (LB1) e 3,74 log UFC/mL (LB2). Esse resultado condiz com o relatado por outros autores, sobre a capacidade de sobrevivência de *S. thermophilus* ao trato gastrointestinal humano (Ziar, Gérard, e Riazi, 2014; Junjua et al., 2016; Silva et al., 2020). No entanto, embora maior resistência de *S. thermophilus* a bile foi observada em meios que possuíam lactose como única fonte de carbono (Ziar, Gérard e Riazi, 2014), no atual estudo, a bactéria provou sua resistência também nas bebidas bubalinas que receberam adição do preparado de polpa de morango, conteúdo, por sua vez, sacarose em sua composição.

A viabilidade com a qual *L. bulgaricus* (Figura 4b) iniciou o ensaio foi de cerca 10^8 UFC/mL para todas as bebidas. Essa população inicial sofreu uma queda expressiva e significativa ($P \leq 0,05$) ao longo do ensaio, principalmente quanto as bebidas lácteas elaboradas com leite de vaca (LV1 e LV2), que chegaram a apresentar redução de 6 log UFC/mL após as duas primeiras fases (F1 e F2), não sendo possível avaliar sua sobrevivência após a fase 3. As bebidas lácteas bubalinas (LB1 e LB2), apresentaram maior população de *L. bulgaricus* em todas as fases no decorrer do ensaio, sendo os únicos produtos a exibirem a bactéria ainda viável ao final da fase 3, apresentando redução de 4 log UFC/mL quando comparado ao início do ensaio (F0). Resultados semelhantes foram relatados em um estudo anterior, que também mostrou maior taxa de sobrevivência de *L. bulgaricus* em produtos lácteos elaborados com leite de búfala (Silva et al., 2020).

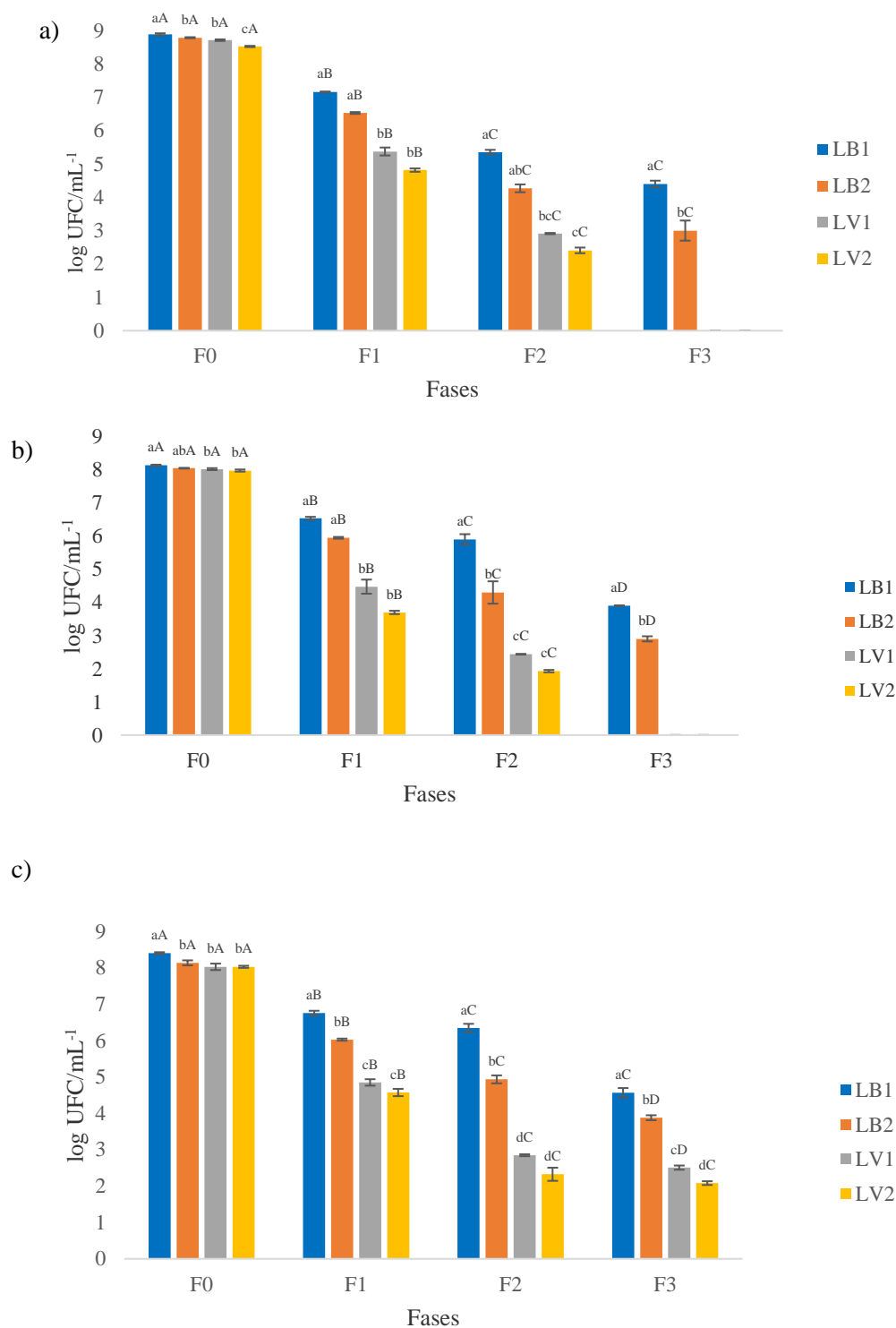


Figura 4. Contagem do número de bactérias viáveis em bebidas lácteas durante a simulação gastrointestinal in vitro. Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*; F0 – tempo zero, antes do início da análise; F1- fase gástrica (2 horas); F2 - primeira fase entérica (4 horas); F3 - segunda fase entérica (6 horas). Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as bebidas lácteas lácteas em um mesmo dia. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) do mesmo produto ao longo do período de análise. N=4.

Com taxa de sobrevivência de *L. acidophilus*, apresentada na Figura 4 (c), é possível observar que, assim como as demais culturas fermentadoras utilizadas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, a população inicial se encontrava em torno de 10^9 UFC/mL e sofreu redução gradativa ao longo das fases constituintes do ensaio. Após a primeira fase (F1) as contagens de *L. acidophilus* exibiram queda significativa ($P \leq 0,05$) em todas as bebidas lácteas elaboradas, apresentando redução de 1-2 ciclos log UFC/mL e cerca de 3-4 ciclos log UFC/mL das bebidas bubalinas e bovinas, respectivamente. Ao final da fase 2, embora *L. acidophilus* tenha apresentado redução de sua população também em todas as bebidas, nas bebidas lácteas bubalinas (LB1 e LB2) essa redução não foi significativa ($P \geq 0,05$), ao contrário do observado nas bebidas lácteas bovinas. Após a fase 3, todas as bebidas lácteas apresentaram células viáveis de *L. acidophilus*, com contagens que variaram entre 10^4 UFC/mL, para as bebidas bubalinas, e 10^2 UFC/mL, para as bebidas bovinas. As contagens finais do *L. acidophilus* estão de acordo com as obtidas por Bedani, et al. (2013) e Casarotti & Penna (2015), mesmo esses autores utilizando uma matriz fermentativa diferente, o que sugere uma boa resistência por parte da bactéria, correspondendo sua característica probiótica de conseguir sobreviver ao trato gastrointestinal humano e chegar viva ao intestino para, assim, desempenhar seus efeitos benéficos a saúde do hospedeiro (Hill et al., 2014; Silva et al., 2020).

Quando comparadas com as bebidas lácteas bovinas, as bebidas lácteas bubalinas apresentaram capacidade superior em manter a viabilidade dos micro-organismos, ao longo da simulação do estresse gastrointestinal *in vitro*, o que, provavelmente, se deve ao fato dessa matriz apresentar teor maior de gordura, possibilitando uma proteção extra ao micro-organismo quanto a ação do ácido, sais de bile e enzimas utilizadas no ensaio, influenciando tanto em uma maior população final de *L. acidophilus* quanto na sobrevivência de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* ao final da simulação do estresse gastrointestinal humano *in vitro*, o que não foi observado nas bebidas elaboradas com leite de vaca (Bedani, et al., 2013; Verruck, et al, 2015; Silva et al., 2020).

As bebidas lácteas que receberam a adição de preparado de polpa de morango (LB2 e LV2) apresentaram contagens significativamente menores do que quando comparadas aos seus respectivos controles (LB1 e LV1). Além das bebidas frutadas apresentarem um teor menor de gordura, a adição para polpa de fruta pode ocasionar porosidade a matriz láctea do produto, o que poderia influir em uma maior fragilidade da estrutura e, conseqüentemente, deixando-a mais susceptível a ação dos ácidos e sais biliares (Silva, 2015). Silva (2015), observou comportamento semelhante em bebidas lácteas adicionadas de polpa de morango, através de análise da matriz fermentada em microscopia eletrônica de varredura (MEV), que demonstrou porosidade elevada nas amostras acrescidas da polpa de morango, quando comparadas ao controle. Mesmo com a adição do preparado de morango e da redução gradativa na viabilidade dos micro-organismos ao longo do ensaio, a bebida láctea bubalina frutada (LB2), conseguiu apresentar células viáveis de

S. thermophilus, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, e, assim, um desempenho superior quanto ao produto semelhante, mas elaborado com leite bovino (LV2).

5. CONCLUSÕES

As bebidas lácteas que receberam adição do preparado de polpa de morango apresentaram teores menores de gordura e proteína.

Quanto ao perfil de pós-acidificação, foi possível concluir que, embora a adição do preparado de polpa de morango tenha resultado em produtos mais ácidos, a bebida láctea bubalina frutada manteve seu pH mais próximo do seu controle e mais estável ao longo do armazenamento refrigerado, quando comparada a bebida bovina.

A adição do preparado de polpa de morango causou um efeito benéfico quanto aos parâmetros reológicos dos produtos, elevando a consistência e viscosidade das bebidas lácteas bubalina e bovina quando comparadas aos seus respectivos controles.

As bebidas lácteas frutadas não apresentaram diferença significativa quanto a maioria dos ácidos graxos analisado em comparação aos seus controles, tendo a bebida láctea bubalina apresentado valores superiores quanto a quantidade de ácido oleico (C:18:1, n-9), ácido linoleico conjugado (C:18:2, CLA) e ácido linolênico (C:18:3, n-3) do que a bebida láctea bovina.

As bebidas lácteas elaboradas com leite de búfala preservaram melhor a viabilidade das culturas fermentadoras, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, ao longo do armazenamento refrigerado. A adição do preparado de polpa de morango à bebida láctea bubalina não influenciou de forma significativa na viabilidade do probiótico *L. acidophilus*.

Embora a bebida láctea bubalina frutada tenha apresentado menor viabilidade das culturas fermentadoras ao final do ensaio de simulação do estresse gastrointestinal *in vitro* em comparação ao seu controle, a adição de polpa de morango não prejudicou o potencial protetor da matriz bubalina e nem o potencial de veiculação de probiótico do produto.

Dessa forma, é possível concluir que a bebida láctea elaborada com leite de búfala e adicionada de polpa de morango, se mostrou superior a bebida láctea bovina quanto a maioria dos parâmetros avaliados neste atual trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKGUN, A.; YAZICI, F.; GULEC, H. A. Effect of reduced fat content on the physicochemical and microbiological properties of buffalo milk yoghurt. **Food Science and Technology**, v. 74, p. 521 – 527, 2016.
- BARROS, R. F.; CUTRIM, C.S.; COSTA, M. P.; CONTE JUNIOR, C. A.; CORTEZ, M. A. S. Lactose hydrolysis and organic acids production in yogurt prepared with different onset temperatures of enzymatic action and fermentation. **Cienc. anim. Bras.**, v.20, 1-10, e-43549, 2019.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, p. 382 – 389, 2013.
- BEZERRA, M. F. MELO, A. F. S. **Caracterização físico-química, reológica e sensorial de iogurte obtido pela mistura dos leites bubalino e caprino**. Natal, 2010. Dissertação de em Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal Do Rio Grande do Norte.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa n.16, 23 de agosto de 2005**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas.
- CALDEIRA, L.; FERRAO, S.; FERNANDES, S.; MAGNAVITA, A.; SANTOS, T. Development of strawberry-flavored milk drink using different yoghurt levels and whey obtained from buffalo's milk. **Ciência Rural**, 40, n.10, p.2193-2198, 2010.
- CAPUCHINHO, L. C. F. M. **Efeito da concentração de soro e da adição de culturas na sinérese e pós-acidificação de bebida láctea fermentada**. Montes Claros, 2018. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- DAMIN, M.R., MINOWA, E., ALCANTARA, 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, p. 40–55, 2008.
- DIBBERN, L. S. **Perfil de ácidos graxos e análise sensorial de carne e iogurte de leite de caprinos alimentados com óleos vegetais**. Botucatu, 2014. Dissertação de em Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- ERTEM, H.; ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and Gobdin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 776–783, 2017.
- EVERETT, D.W., MCLEOD, R. E. Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yogurt. **International Dairy Journal**, v.15, n.11, 1175–1183, 2005.

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: FAO/WHO, 2002.

FERNANDES, A. F. C.; COLPA, P. C.; PAIVA, E. F. F.; PAIVA, L. C.; NACHTIGALL, A. M.; BOAS, B. M. V. Vida de prateleira de iogurte sabor café. **Coffee Science**, v. 11, n. 4, p. 538 - 543, 2016.

GOMES, R.G.; PENNA, A.L.B. Características reológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.3, p.629-646, 2009.

GUIMARÃES, D. H. P.; SILVA, F. R. S. R.; LÊNTHOLA, N. M. Yogurt produced with buffalo milk flavoured with cheese and guava jelly. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.18, n. 1, p. 57-61, 2015.

GURJÃO, F. F.; CARNEIRO, G. G.; PESSOA, T.; SILVA, D. R. S.; PÊ, P. R. Comportamento reológico de iogurte de cajá comercializado em Campina Grande, Paraíba. **Revista Verde**, v. 10, n.2, p. 257 - 260, 2015.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B., MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506 – 514, 2014.

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. 533p.

JUNJUA, M.; KECHAOU, N.; CHAIN, F.; AWUSSI, A. A.; ROUSSEL, Y.; PERRIN, C., ROUX, E.; LANGELLA, P.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; ROUX, Y.; CHATEL, J.; DARY-MOUROT, A. A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. **Food of Science and Technology**, v. 70, p. 78 – 87, 2016.

KOWALESKI, J. **Iogurte probiótico à base de frutas exóticas de Laranjeiras do Sul/PR.** Natal, 2010. Dissertação de em Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Modeling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 83, p. 437 – 446, 2003.

LOPES, F. C. F.; BARROS, P. A.V.; BRUSCHI, J. H.; SILVA, P. H. F.; PEIXOTO, M. G. C. D.; GOMIDE, C. A. M.; DUQUE, A. C. A.; GAMA, M. A. S. Perfil de ácidos graxos no leite de vacas Holandês em pastagens tropicais suplementadas com dois níveis de concentrado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n.2, p. 518-521, 2011.

LUCEY, J.A. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 281-294, 2002.

- MARINHO, M. V. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M.; SANTIAGO, V. M. S.; GOMES, J. P. Análise físico-química e sensorial de iogurte de leite de cabra com polpa de umbu. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 14, p. 497-510, 2012.
- MATHIAS, T.R.S.; ANDRADE, K.C.S.; ROSA, C.L.S.; SILVA, B.A. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p.12-20, 2013.
- MATIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MASTSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr.**, v. 19, p. 761-770, 2006.
- MELO, A. F. S. **Produção de iogurte integral e parcialmente desnatado de leite de búfala com diferentes concentrações de açúcar**. Porto Alegre, 2018. Trabalho de Conclusão de - Bacharelado em Zootecnista, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MEYBODI, N. M.; MORTAZAVIAN, A. M.; ARAB, M.; NEMATOLLAHI, A. Probiotic viability in yogurt: a review of influential factors. **International Dairy Journal**, 2020.
- MILANI, M. P.; VARGAS, D. P.; NÖMBERG, J. L. Perfil de ácidos graxos de iogurte produzido com diferentes culturas bacterianas. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 23, n. 1-2, p. 109-112, 2016.
- MONTEIRO, C. L. **Desenvolvimento e caracterização de iogurte concentrado tipo grego de leite bubalino adicionado de calda de frutas amazônicas**. Belém, 2019. Trabalho de conclusão de curso - Bacharelado em Zootecnia, Universidade Federal Rural da Amazônia.
- MOUSAVI, M.; HESHMATI, A.; GARMAKHANY, A. D.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 102, p. 80 – 88, 2019.
- OLIVEIRA, R. L.; LADEIRA, M. M.; BARBOSA, M. A. A. F.; MATSUSHUTA, M.; SANTOS, G. T.; BEGALDO, A. R.; OLIVEIRA, R. L. Composição química e perfil de ácidos graxos do leite e muçarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.736-744, 2009.
- PAPPIANI, C. **Efeito dos ácidos graxos ômega -3, ômega-6 e ômega-9 sobre o risco cardiovascular em indivíduos adultos: Estudo clínico de prevenção primária**. São Paulo, 2016. Dissertação de em Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Nutrição em Saúde, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
- PARKER, E. A.; ROY, T.; D'ADAMO, C. R.; WIELAND, L. S. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, p. 125 – 134, 2018.
- PASEEPHOL, T.; SMALL, D.M.; SHERKAT, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. **Journal of Texture Studies**, v.39, n.6, p.617-634, 2008.
- PECOVÁ, L.; SAMKOVÁ, E.; HANUŠ, O.; HASOŇOVÁ, L.; ŠPIČKA, J. Fatty acids stability in goat yoghurt. **Ciência Rural**, v.49, 2019.

- PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e de vaca. **Revista Caatinga**, v.27, p.226-233, 2014.
- REVERS, L. M.; DANIELLI, A. J.; ILTCHENCO, S.; ZENI, J.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. Obtenção e caracterização de iogurtes elaborados com leites de ovelha e de vaca. **Rev. Ceres**, v. 63, n.6, p. 747-753, 2016.
- RICCI G. D.; DOMINGUES P. F. O leite de búfala. **Animal Science of CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 10, n. 1, p. 14–19, 2012.
- SILVA, T. M. S. **Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado**. São Paulo, 2015. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- SILVA, T. M. S.; PIAZENTIN, A. C. M.; MENDONÇA, C. M. N.; CONVERTI, A.; BOGSAN, C. S. B.; MORA, D.; OLIVEIRA, R. P. S. Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, n. 9, 2020.
- SIQUEIRA, A.M.O.; MACHADO, E.C.L. STAMFORD, T.L.M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.9, p.1693-1700, 2013.
- STEFFE, J.F. **Rheological methods in food processengineering**. 2nd ed. Freeman Press: Michigan, p. 418, 1996.
- SUN, Q.; LV, J.; LIU, L.; ZHANG, S.; LIANG, X.; LU, J. Comparison of milk samples collected from some buffalo breeds and crossbreeds in China. **Dairy Sci. & Technol.**, V. 94, p. 387–395, 2014.
- YADAV, H.; JAIN, S; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v. 23, p. 63-68, 2007.
- ZHU, X.; GUO, W.; LIANG, Z. Determination of the Fat Content in Cow's Milk Based on Dielectric Properties. **Food Bioprocess Technol.**, v. 8, p. 1485–1494, 2015.
- ZIAR, H.; GÉRARD, P.; RIAZI, A. Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94. p. 1184 – 1190, 2014.

• **CAPÍTULO** •

4

Avaliação do efeito da suplementação de L-triptofano em iogurtes probióticos e em suas culturas fermentadoras.

RESUMO

O triptofano é um aminoácido essencial e precursor da serotonina, associada a importantes manutenções metabólicas e neurológicas. Sua deficiência no organismo pode levar o indivíduo a desenvolver quadros de depressão, estresse, ansiedade e insônia. A suplementação de triptofano em produtos lácteos probióticos poderia complementar os níveis do aminoácido na dieta humana, além de proporcionar benefícios a saúde relacionados ao consumo de probióticos. Por isso, esse estudo se propôs a avaliar a possibilidade da suplementação de triptofano em produtos lácteos probióticos, bem como seu efeito no produto e em suas culturas fermentadoras. Para isso, iogurtes probióticos foram produzidas a partir de leite bovino, fermentados pelas culturas lácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*. Os iogurtes suplementados ou não com triptofano, permaneceram armazenados a 4°C por 14 dias e a 25° por 7 dias. Neste período, foram analisados quanto ao perfil de pós-acidificação, quantidade de triptofano ao longo do armazenamento, viabilidade das culturas lácticas por plaqueamento e por citometria de fluxo. Adicionalmente, as culturas lácticas foram testadas quanto influência do triptofano na produção de compostos antimicrobianos e quanto ao seu crescimento, quando associado a diferentes fontes de carbono. A adição de triptofano ao meio de cultivo, principalmente contendo glucose, contribuiu para um melhor crescimento de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Todas as culturas lácticas apresentaram atividade contra *Listeria monocytogenes*, tendo *S. thermophilus* apresentado aumento de cerca de 87 UA/mL de atividade no meio contendo triptofano. A adição do triptofano após a fermentação não afetou de forma perceptiva a pós acidificação dos iogurtes com relação ao controle, diferente dos produtos fermentados com o aminoácido. Maior população de *L. acidophilus* foi observada nos iogurtes adicionados de triptofano, tendo a viabilidade do probiótico se mostrado melhor e mais estável quando a adição do aminoácido ocorreu após a fermentação. Com a contagem de células totais por citometria de fluxo, foi possível observar que os iogurtes contendo triptofano apresentaram aumento das células vivas e menor dano as bactérias ao longo do armazenamento. A adição do triptofano aos iogurtes após a fermentação, promoveu maior teor do aminoácido ao final armazenamento do produto, bem como, melhor estabilidade com o estudo, foi possível concluir a adição de triptofano em produtos lácteos probióticos pode contribuir para a complementação do aminoácido na dieta do consumidor e, adicionalmente, influências beneficemente as culturas probióticas utilizadas.

Palavras-chave: triptofano, iogurtes, probióticos, compostos antimicrobianos, citometria de fluxo

1. INTRODUÇÃO

O triptofano é um aminoácido essencial ao organismo humano, responsável por auxiliar em diversas funções metabólicas, como o crescimento, síntese proteica e na síntese do neurotransmissor serotonina. Por ser um aminoácido, o qual o corpo humano é incapaz de produzir, sua obtenção é totalmente dependente da dieta, podendo ser encontrado naturalmente em vegetais e proteínas animais, porém de forma limitada (Carvalho-Santos *et al.*, 2010; Zenello, 2012).

A serotonina é um neurotransmissor que atua no sistema nervoso central, em importantes manutenções metabólicas, como na regulação de fatores adaptativos essenciais responsáveis, or exemplo, pelo controle da ansiedade, apetite, sono, humor e regulação de hormônios (Feijó *et al.*, 2010; Palego *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2018). Uma vez que, a quantidade de serotonina necessária para desempenhar sua função no organismo é dependente da ingestão de triptofano através da alimentação, a deficiência de triptofano na dieta, conseqüentemente, pode gerar baixos níveis de serotonina podendo levar o indivíduo a desenvolver distúrbios e psicopatologias associados a quadros de depressão, estresse, ansiedade e insônia (Zenello, 2012).

A suplementação de triptofano em produtos lácteos fermentados probióticos, como iogurtes e bebidas lácteas, poderia suprir a possível deficiência desse aminoácido na dieta humana. Iogurtes probióticos são produtos com grande aceitabilidade para consumo diário, podendo ser inseridos em uma dieta equilibrada, sendo capazes de promover benefícios à saúde do consumidor que vão além da nutrição básica (Silva, 2015; Geraldi *et al.*, 2017). Isso porque, lácteos fermentados probióticos possuem em sua composição, micro-organismos vivos que, ao serem consumidos em quantidades adequadas, podem conferir benefícios a saúde do consumidor, auxiliando na manutenção da saúde e atuando no trato gastrointestinal humano, principalmente, quanto ao equilíbrio da microbiota e na melhora da imunidade (Souza *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2020).

Por esse motivo, esse estudo se propôs a avaliar a possibilidade da suplementação de triptofano em produtos lácteos probióticos, bem como seu efeito no produto e em suas culturas fermentadoras. Para isso, iogurtes probióticos foram produzidas a partir de leite bovino, fermentado pelas culturas lácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Ingredientes

Os iogurtes probióticos foram elaborados a partir de leite bovino, fermentados com culturas lácticas e recendo adição ou não de triptofano.

O leite bovino pasteurizado (Latte Milano, Soresina (CR), Itália) foi adquirido diretamente de lojas de varejo da cidade de Milão (MI), Itália.

Para suplementação dos produtos e do meios de cultivo foi utilizado triptofano isolado (Sigma-Aldrich, Milão, Itália).

2.1.2. Culturas bacterianas e meios de cultivo

Para a fermentação dos iogurtes, foram utilizadas as seguintes culturas bacterianas: *Streptococcus thermophilus* TA040 (DuPont, França), *Lactobacillus bulgaricus* LB340 (DuPont, França) e *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen, Dinamarca).

Para o cultivo das culturas bacterianas, foram utilizados os seguintes meios de cultura: MRS (Difco, Le Pont de Claix, França); M17 (Difco, Le Pont de Claix, França); Laptg : peptona (15 g/L), triptona (10 g/L), extrato de levedura (10 g/L), Tween 80 (1 mL), fonte de carbono (lactose, maltose ou glucos – 10 g/L) e pH ajustado para 6,5.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Avaliação do efeito da presença de Triptofano e de diferentes fontes de carbono no crescimento bacteriano

Para a avaliação do efeito da presença de triptofano no crescimento de bactérias, estas foram cultivadas em caldo MRS (*L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) e M17 (*S. thermophilus*) por 24 horas à 37°C. O cultivo, então, foi centrifugado a 4470 xg por 15 minutos e seu sobrenadante descartado. As células foram lavadas com solução salina 0,85% duas vezes, sendo suspensas e centrifugadas novamente em cada uma das vezes. O volume inicial do cultivo foi restituído com a mesma solução salina e sua D.O. foi ajustada para 0,1 - 0,2 antes de ser inoculado no meio de cultivo LAPTg suplementado com lactose, maltose ou glucose na concentração de 10 g/L, contendo ou não de triptofano 0,5% (m/v) , na proporção de 1:1 na placa de 96 poços.

A placa contendo os cultivos foi encaminhada até o leitor de microplaca Synergy™ HTX (Biotek, Shoreline, WA), onde as bactérias ficaram incubadas durante 24 horas a 37°C. Em

intervalos de 15 minutos ao longo desse período, a placa foi agitada de forma linear e sua densidade ótica foi medida em 600 nm, avaliando o crescimento de cada bactéria diante das condições determinadas. A análise foi realizada em triplicata para a obtenção dos resultados médios.

2.2.2. Determinação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de célula (SLC)

Para a determinação da atividade antimicrobiana, as bactérias a serem analisadas foram cultivadas no meio MRS (*L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) e M17 (*S. thermophilus*) por 48 horas à 37°C. Esse cultivo foi, então, centrifugado a 4470 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina 10%, sendo suspensas na solução e centrifugadas novamente em cada uma das vezes. O volume final do cultivo foi restituído com a mesma solução salina, após ter sua D.O. ajustada para 0,8 – 0,9, e uma alíquota desse foi então inoculada em tubos Falcon contendo meio mínimo (Laptg) e incubado a 37°C por 48 horas.

Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 4470 xg por 15 minutos. O sobrenadante, então, teve seu pH ajustado para 6,0 – 6,5 com NaOH 1M e levado ao banho-maria a 80°C por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em micro tubos com filtros com porosidade de 0,45 µm de diâmetro (Millipore, Billerica, MA, USA) e alíquotas de 10 µl foram pingadas em placas contendo *Listeria monocytogenes* ScotA, sendo incubadas a 37° por 24 horas para a avaliação da atividade.

O diâmetro da zona de inibição foi medido em milímetros e a atividade medida em unidades arbitrárias (AU) por mL com o uso da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade BLIS (AU/mL)} = \pi R^2 / V$$

2.2.3. Suplementação de Triptofano em iogurte

A avaliação da suplementação de triptofano em iogurtes probióticos foi realizada na elaboração de 3 produtos distintos, os quais estão descritos na Tabela 1. Todos os iogurtes foram elaborados com leite bovino pasteurizado e suplementados com triptofano em duas etapas diferentes, sendo estas antes da fermentação e após a fermentação. Iogurtes sem a adição de triptofano foram utilizados como controle.

Os iogurtes foram avaliados quanto ao perfil de pós-acidificação, quantidade de triptofano presente nos produtos, população das culturas fermentadoras *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus* por plaqueamento e citometria.

Tabela 1. Delineamento experimental para a elaboração de iogurtes probióticas suplementados com L-triptofano.

Iogurtes elaborados	Triptofano (g/100g)
IG	-
IG FT	0,05
IG T	0,05

Onde: IG: iogurte controle; IG FT: iogurte fermentado com triptofano; IG T: iogurte adicionado de triptofano após a fermentação.

Para isso, as culturas fermentadoras foram cultivadas por 24 horas a 37°C em caldo M17 (Difco, Le Pont de Claix, França) (*Streptococcus thermophilus*) e MRS (Difco, Le Pont de Claix, França) (*Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*). Previamente à fermentação, um inóculo foi preparado a partir do cultivo dessas culturas, cujos tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm e seu sobrenadante foi descartado. Os precipitados restantes nos tubos foram lavados com solução salina (0,85%) e, novamente, os tubos foram levados à centrifugação nas mesmas condições já descritas. Essa etapa de lavagem das células foi executada 3 vezes e, por último, estas foram suspensas em leite estéril. Para a fermentação, alíquotas desses inóculos foram adicionados ao leite pasteurizado de modo a possibilitar a população inicial de cerca de ~5.0 logUFC/mL.

Para a fermentação, o leite pasteurizado foi transferido para frascos Schott estéreis e, posteriormente, inoculados com as culturas fermentadoras *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*. Em seguida, a adição do triptofano foi realizada ao produto IG FT (Tabela 1). Os frascos, então, foram colocados em estufa a 37°C por 24 horas para fermentação. Após esses períodos, os frascos foram levados ao banho de gelo por 10 minutos, para interromper a fermentação, e o coágulo foi quebrado, através de movimentos verticais, com o auxílio de um bastão de aço, como descrito por Silva (2015). Após a quebra do coágulo, foi realizada a adição de triptofano ao produto IG T (Tabela 1). Os iogurtes foram transferidos para frascos estéreis e armazenados a 25°C e a 4°C por até 14 dias.

Enquanto o armazenamento a 4°C nos ajuda a visualizar as reações que ocorrem no produto nas condições ideais de armazenamento, na temperatura na qual ele deve ser comercializado, o armazenamento a 25°C possibilita observar alterações nos produtos em um menor tempo, que levariam mais dias para ocorrer sob refrigeração.

2.2.4. Perfil de pós-acidificação

A pós-acidificação dos iogurtes probióticos produzidas foi analisado por meio da medição dos valores de pH, através de potenciômetro digital (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), ao longo de seu armazenamento a 25°C e 4°C. As medições do pH foram realizadas em triplicata diariamente ao longo de 7 dias (25°C) e após 1, 7 e 14 dias (4°C) seguido da fermentação.

2.2.5. Viabilidade das culturas fermentadoras

Para a enumeração do número de células viáveis das culturas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*, presentes nos iogurtes, foi realizada a mesma metodologia aplicada nos trabalhos anteriores, descrita em Silva et al. (2020), onde amostras de 1 mL dos iogurtes elaborados foram adicionados em 9 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizadas durante 1 min em um agitador de tubo. Em seguida, as amostras foram diluídas de forma seriada e inoculadas em meios seletivos. O meio de cultura utilizado para enumerar a bactéria *S. thermophilus* foi ágar M17 (Difco, Le Pont de Claix, França), da mesma forma, o meio ágar MRS (Difco, Le Pont de Claix, França) com o pH ajustado para 5,4 foi utilizado para a enumeração de *L. bulgaricus*, tendo ambas bactérias sido incubadas a 37°C por 72 horas. O meio modificado ágar MRS adicionado de solução de maltose 50% foi utilizado para enumerar *L. acidophilus*, após incubação a 37°C por 72h em jarra de anaerobiose de acordo com a metodologia descrita por Dave e Shah (1996) e Saccaro et al. (2011). As condições de anaerobiose foram estabelecidas usando-se AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke). As placas contendo de 30 a 300 colônias selecionadas para serem enumeradas e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL de produto (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata diariamente ao longo de 7 dias (25°C) e após 1, 7 e 14 dias (4°C) seguido da fermentação.

2.2.6. Contagem de células totais por citometria de fluxo

Amostras de iogurtes foram avaliadas quanto a uma possível influência do triptofano sobre bactérias lácticas utilizadas na fermentação, durante o armazenamento a 25°C e 4°C. Para isso, foi realizada a quantificação de bactérias totais das amostras através do método de plaqueamento (descrito no item 2.2.5.) e pelo método de citometria de fluxo descrito por Arioli et al. (2016).

A contagem de células totais de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* presentes nos iogurtes por citometria de fluxo foi feita ao longo de seu armazenamento a 25°C (dias 1, 4 e 8) e 4°C (1, 5 e 10 dias). Para isso, uma alíquota de 500 µL da amostra foi suspendida na mesma

quantidade de HCl (2 M), EDTA (0,2 M) no pH 8. A mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos e, em seguida, a suspensão de células foi marcada com SYBR Green (Sigma-Aldrich, Milão, Itália). Após passar por uma nova incubação a 37° por 20 minutos, a suspensão foi diluída até 10⁶ e analisada em citômetro de fluxo (BD Biosciences, Milão, Italia).

2.2.7. Determinação do L-Triptofano por cromatografia de troca iônica

Os métodos de extração e quantificação de Triptofano nos iogurtes analisados, foram baseados no trabalho de Hogenboom et al. (2017), sobre a quantificação de aminoácidos totais em produtos lácteos. Para a extração, 1,5 g de amostra foi adicionada em um Erlenmeyer de 100 mL, seguido de 40 mL de tampão citrato trissódico 0,2 N (pH 2,2), e mantido sob agitação magnética por 15 minutos. Após esse tempo, a mistura foi homogeneizada com Ultra-turrax por 5 minutos a 11000 rpm. O extrato foi, então, filtrado em papel filtro (Whatman 41, GE Healthcare, Milão, Itália) e 10 mL do conteúdo filtrado foi transferido para um balão volumétrico lentamente, recebendo, sob agitação, a adição de 10 mL de uma solução de 7,5% (m/v) de ácido 5-sulfossilicílico. Após 5 minutos sob agitação constante, o conteúdo foi novamente filtrado em papel filtro (Whatman 41, GE Healthcare, Milão, Itália) e, em seguida, 10 mL deste foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. Por fim, foi adicionado ao mesmo balão 2 mL de solução de L-norleucina, antes deste de ser completado com solução tampão de citrato tri-lítio 0,2 N (pH 2,2) e filtrado em filtro de celulose 0,2 µm (Minisart® RC 25, Sartorius, Goettingen, Alemanha), previamente a injeção da amostra.

A quantificação de triptofano nas amostras foi realizada através de cromatografia por troca iônica nas mesmas condições e equipamento utilizado descritos por Hogenboom et al. (2017).

3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O tratamento dos dados foi realizado através de análise de variância multifatorial (ANOVA) e testes de comparação de média utilizando o programa Minitab 17.0 a fim de determinar a significância estatística da diferença entre as médias. As médias foram comparadas através do teste de Tukey usando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência do Triptofano e de diferentes fontes de carbono no crescimento bacteriano

Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de crescimento das bactérias lácticas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* em meio de cultivo LAPTg, suplementados com lactose, maltose ou glucose, contendo ou não o aminoácido triptofano.

Com as curvas de crescimento de *S. thermophilus*, podemos observar que os meios de cultivo contendo lactose, apresentaram o maior crescimento de *S. thermophilus*, tendo o seu ponto maior absorvância (0,215 e 0,214 D.O.) entre 1,5 – 2 horas após o início da fermentação nos meios sem e com triptofano, respectivamente. O melhor desenvolvimento do *S. thermophilus* nessas condições já era esperado, uma vez que a bactéria é conhecida por metabolizar a lactose mais facilmente (Sorensen, *et al.* 2016). A adição de triptofano ao meio de cultivo contendo maltose, não influenciou de forma perceptível no crescimento de *S. thermophilus*, que apresentou D.O. de 0,196 após cerca de 1,5 horas após o início do experimento, tendo esse seu pico de crescimento tanto no meio contendo somente maltose quanto no meio também suplementado com o aminoácido.

Em contrapartida, a adição de triptofano no meio de cultivo contendo glucose como fonte de carbono, alterou de forma considerável o crescimento de *S. thermophilus* ao longo da fermentação. No meio LAPTg contendo apenas glucose, *S. thermophilus* chegou ao seu ponto alto de crescimento após 2 horas, apresentando uma D.O. de 0,195. Já no meio contendo também o aminoácido, *S. thermophilus* levou 5 horas para atingir a mesma concentração de células (0,195 D.O.), porém, nessa condição a cepa conseguiu se manter estável durante todo o tempo de ensaio, com cerca de 0,2 D.O., diferente do meio sem triptofano, que apresentou redução considerável na concentração de bactérias após seu pico de crescimento, exibindo uma variação de 0,195 até 0,015 D.O. até o final do ensaio. Essa estabilidade, pode estar relacionada com a adição de triptofano ao meio, pois, além da comparação com a condição de cultivo sem o aminoácido, mas também contendo glucose, *Streptococcus* spp. é conhecida por metabolizar alguns aminoácidos dentre eles triptofano, o que poderia estar influenciando em uma possível manutenção de sua viabilidade (O'Mahony *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de *L. bulgaricus* foi melhor nos meios sem a adição de triptofano, apresentado um crescimento reduzido, com picos menores de concentração de células, nas condições de cultivo contendo o aminoácido. Nos meios de cultivo contendo glucose e lactose, foram onde *L. bulgaricus* apresentou melhor crescimento, com D.O. de 0,589 e 0,468, respectivamente, após 4 horas de fermentação. A suplementação dos meios com o triptofano, não influenciou quanto ao tempo de fermentação onde o pico de crescimento foi alcançado, mas afetou

o crescimento de *L. bulgaricus* que, por sua vez, apresentou D.O. máxima de 0,475 para o meio contendo glucose, e 0,401 para o meio contendo lactose.

No caso de *L. acidophilus* a adição de triptofano no meio de cultivo contendo glucose resultou no melhor crescimento, apresentando seu pico de crescimento entre 6 – 8 horas de fermentação e mantendo a D.O. em cerca de 0,600 ao longo do ensaio. Já o meio contendo glucose, mas sem a presença do aminoácido, *L. acidophilus* apresentou seu pico de crescimento após 6 horas de fermentação com uma D.O. de 0,426, mas leitura final da absorbância foi de 0,335. A presença do triptofano também influenciou o crescimento de *L. acidophilus* nos meios contendo lactose, onde exibiu D.O. de 0,277 e 0,318 nos meios sem e com triptofano, respectivamente. Esses resultados demonstram a capacidade do triptofano em favorecer o desenvolvimento de *L. acidophilus*, o que pode estar associado com sua capacidade de metabolizar o triptofano em outros compostos, podendo ser utilizado também como substrato ao longo da fermentação, possivelmente influenciando no crescimento da bactéria durante o ensaio (Zelante *et al.*, 2013).

A presença do triptofano influenciou de forma positiva crescimento tanto *S. thermophilus* quanto *L. acidophilus*, que apresentaram melhor desenvolvimento quando o aminoácido foi combinado com glucose. Em vista disso, essa condição foi selecionada para o ensaio de atividade antimicrobiana, onde foi utilizado o meio LAPTg suplementado com glucose e triptofano, além dos meios de cultura comerciais de preferência das culturas avaliadas.

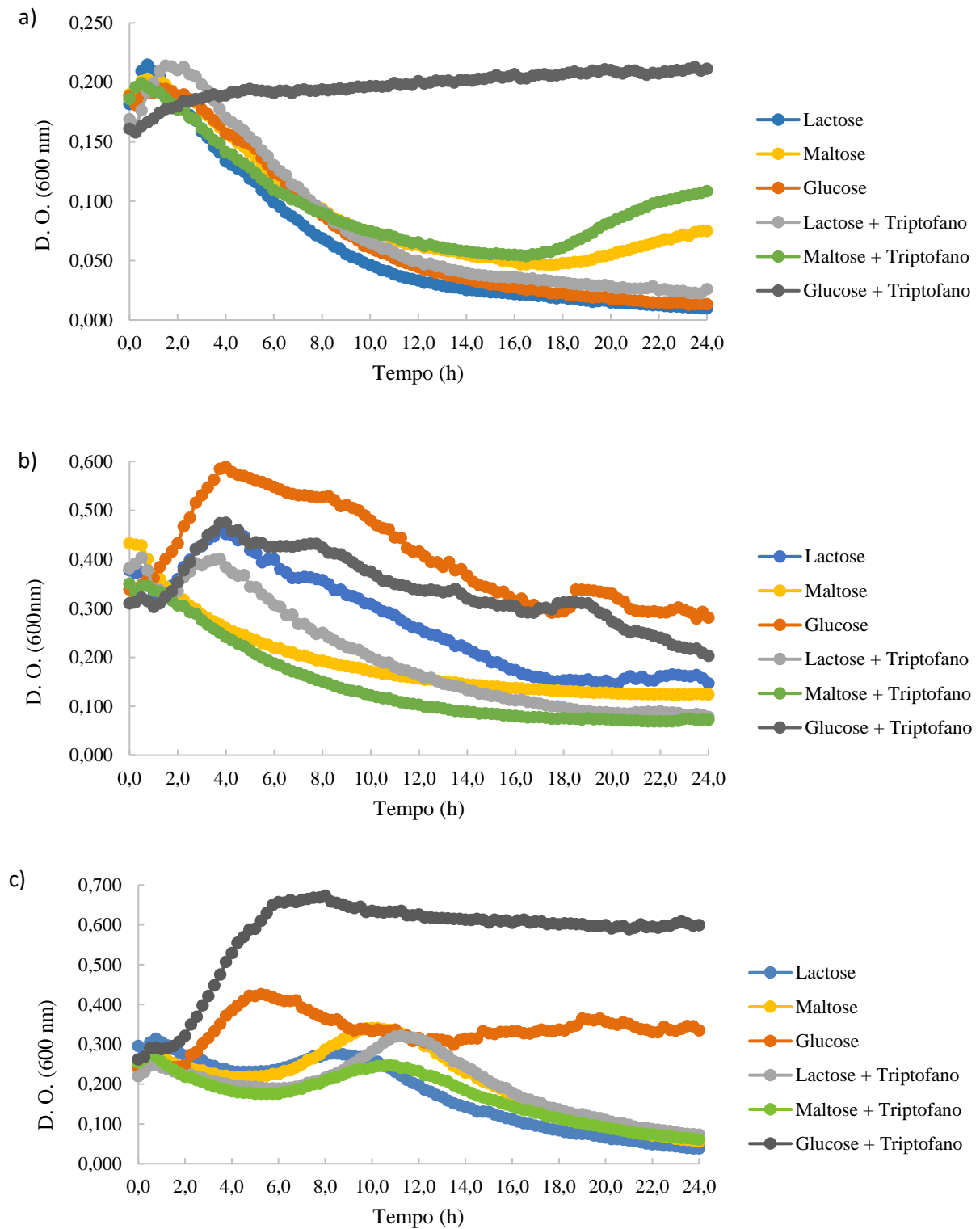


Figura 1. Curva de crescimento das culturas fermentadoras realizada através da leitura de absorbância (600 nm) em leitor de microplaca durante 24h a 37°C, utilizando meio de cultivo LAPTg suplementado com lactose, maltose ou glucose, acrescidos ou não de triptofano 0,5% (m/v). Onde: a) *S. thermophilus*; b) *L. bulgaricus*; c) *L. acidophilus*.

4.2. Produção de compostos antimicrobianos pelas culturas fermentadoras

Conforme descrito no método 2.2.2. e apresentado na Tabela 2, a atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células (SLC) foi avaliada através da técnica de ágar difusão contra a cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Dentre as três cepas avaliadas quanto a sua capacidade de produção de compostos antimicrobianos, podemos observar que *S. thermophilus* foi a que apresentou as maiores atividades que variaram de 226,86 a 314 UA/mL, quando cultivadas nos meios LAPTg sem e com a presença de triptofano, respectivamente. Apesar do aumento de cerca de 87 UA/mL de atividade no meio contendo triptofano, tal resultado foi diferente do observado por De Vuyst (1995), onde, mesmo após a suplementação com triptofano, a produção de nisina não foi afetada, mantendo-se igual ao meio sem adição do aminoácido.

A atividade antilistérica observada no presente estudo também foi observada por Villani et al. (1995) e Ivanova et al. (1998), os quais purificaram as bacteriocinas produzidas pelas cepas *S. thermophilus* 347 e 81, respectivamente. Já Rossi et al. (2013) isolaram 75 cepas de *S. thermophilus* das quais todas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e três contra *Escherichia coli*. Estes trabalhos demonstram o potencial das cepas de *S. thermophilus* produzirem bacteriocinas, o que tornaria sua aplicação mais fácil, uma vez que as mesmas são consideradas seguras para consumo, sendo largamente utilizadas na preparação de lácteos como iogurtes e queijos (Moracanin et al, 2014).

A cepa avaliada de *L. bulgaricus* apresentou atividade de 38,46 UA/mL, apenas quando cultivada em MRS. Apesar de exibir atividade menor do que comparada ao trabalho de Kim et al. (2004), que ao relatou atividade de 320 UA/mL para o *L. bulgaricus*, este vem apresentando boa atividade contra os patógenos *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Simova et al., 2008; Mahmood et al., 2015). Outro fator que deve ser levado em consideração é que as cepas de *L. bulgaricus* são produtoras de peróxido de hidrogênio, composto também conhecido por sua atividade antimicrobiana que pode ser responsável por parte de inibição do crescimento de patógenos (Martín & Suárez, 2010; O'Hanlon et al. 2013).

A atividade exibida por *L. acidophilus* foi 56,72 UA/mL, cerca de 32% maior do que a apresentada por *L. bulgaricus*, porém somente quando cultivada em LAPTg. *L. acidophilus* é conhecido por produzir bacteriocinas como as lactacinas e acidocinas (Moracanin et al. 2014; Abbasiliasi, et al. 2017; Gaspar et al. 2018). O estudo realizado por Tabasco et al. (2009) demonstrou que o *L. acidophilus* La-5, tem sua produção de lactacina aumentada quando induzido por outra bactéria ácido láctica, comprovando que a cepa La-5 é capaz de produzir BLIS (*Bacteriocin Like Innibitory Substances*) e bacteriocinas.

Podemos observar que a maior parte das atividades foram apresentadas nos meios de cultivo LAPTg com e sem a presença de triptofano, mesmo esse meio possuindo metade da quantidade de glicose (10 g/L) em sua composição quando comparado com os meios comerciais para lactobacilos. O meio LAPTg ele é rico em fontes de nitrogênio (78% de sua composição) que pode influenciar a produção de BLIS e bacteriocinas, como apresentado no estudo de Avonts et al. (2004), onde observou um aumento na produção de bacteriocina por *L. acidophilus* IBB 801, após suplementar o meio de cultivo com 1% de extrato de levedura. De forma semelhante, Aasen et al. (2000), observou que quanto maiores as suplementações com extrato de levedura e triptona (10 e 15%), maior a produção de sakaicina por *L. sakei* CCUG 42687. Assim, podemos observar a importância das fontes de nitrogênio para a produção de compostos antimicrobianos, podendo sua suplementação influir no aumento da produção de BLIS e bacteriocinas.

Tabela 2. Espectro de inibição dos BLIS produzidos pelas cepas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, quando cultivados nos meios MRS, M17, LAPTg com e sem adição de triptofano.

Meio de cultivo	Zona de inibição*		
	<i>S. thermophilus</i> TA040	<i>L. bulgaricus</i> LB340	<i>L. acidophilus</i> LA-5
MRS	-	+	-
M17	-	-	-
LAPTg	+++	-	+
MRS triptofano	-	-	-
M17 triptofano	+	-	-
LAPTg triptofano	+++	-	-

* (++++) 20,0 – 15,0 milímetros, (++) 14,9 – 10,0 milímetros, (+) 9,99 – 5,0 milímetros, e (-) quando não houve presença de zona de inibição.

4.3. Perfil de pós-acidificação

O perfil de pós-acidificação dos iogurtes armazenados sob diferentes temperaturas (25°C e 4°C) é apresentado na figura 2.

Todos os iogurtes elaborados apresentaram redução gradativa dos valores de pH ao longo do armazenamento em ambas as temperaturas, tendo os produtos apresentado um pH entre 3,87 e 3,90 ao final do armazenamento a 25°C, enquanto os produtos armazenados a 4°C exibiram um

pH final entre 4,04 e 4,11. Comportamento semelhante foi observado em estudos avaliando pós acidificação de bebidas lácteas (Silva *et al.*, 2020) e iogurtes (Silva, 2013; Mousavi *et al.*, 2019). Ainda que este comportamento seja considerado característico dos produtos lácteos fermentados, que tendem a apresentar decréscimo gradual de seu pH ao longo do armazenamento, o controle da pós-acidificação é um parâmetro importante para a indústria, auxiliando na diminuição de perdas do produto e, quanto aos lácteos probióticos, na manutenção da viabilidade das culturas probióticas neles presentes (Thamer & Penna, 2006; Silva, 2013; Capuchinho, 2018).

Com os resultados obtidos, foi possível observar que o iogurte fermentado com triptofano (IG FT), independente da temperatura de armazenamento, mostrou um pH significativamente ($P \leq 0,05$) mais baixo que o iogurte controle (IG) e o iogurte que recebeu adição do triptofano após a fermentação (IG T). Essa diferença se torna mais expressiva no 2º dia de armazenamento a 25°C e no 7º dia de armazenamento a 4°C, quando os iogurtes (IG FT) apresentaram um decréscimo de 0,13 e 0,22, respectivamente, com relação ao início do armazenamento. Esses primeiros dias após a fermentação é quando o produto pode sofrer uma pós acidificação mais intensa, devido a atividade metabólica das culturas fermentadoras estarem mais persistentes (Moretti, 2009; Silva, 2013; Silva *et al.*, 2020).

Uma vez que observamos que o triptofano pode influenciar positivamente o crescimento das culturas lácticas utilizadas (4.1.), principalmente quanto ao crescimento de *L. acidophilus*, a presença do triptofano durante a fermentação dos produtos (IG FT) pode ter contribuído para que as bactérias apresentassem um metabolismo mais ativo mesmo após a fermentação, intensificando a acidificação dos iogurtes nos primeiros dias de armazenamento quando comparados aos demais produtos (IG e IG T).

Os iogurtes que receberam a adição de triptofano após a fermentação (IG T) não apresentaram diferença significativa ($P \geq 0,05$) quanto ao perfil de pós acidificação dos iogurtes controle (IG) durante quase todo o seu armazenamento, tanto a 25°C quanto a 4°C. O produto IG T mostrou diferença ($P \leq 0,05$) com relação ao seu controle (IG) somente no 14º dia de armazenamento a 4°C, onde os valores de pH obtidos foram de 4,11 (IG T) e 4,04 (IG). Esse resultado mostra que suplementando o aminoácido após a fermentação, este não exerce influência na pós acidificação do produto.

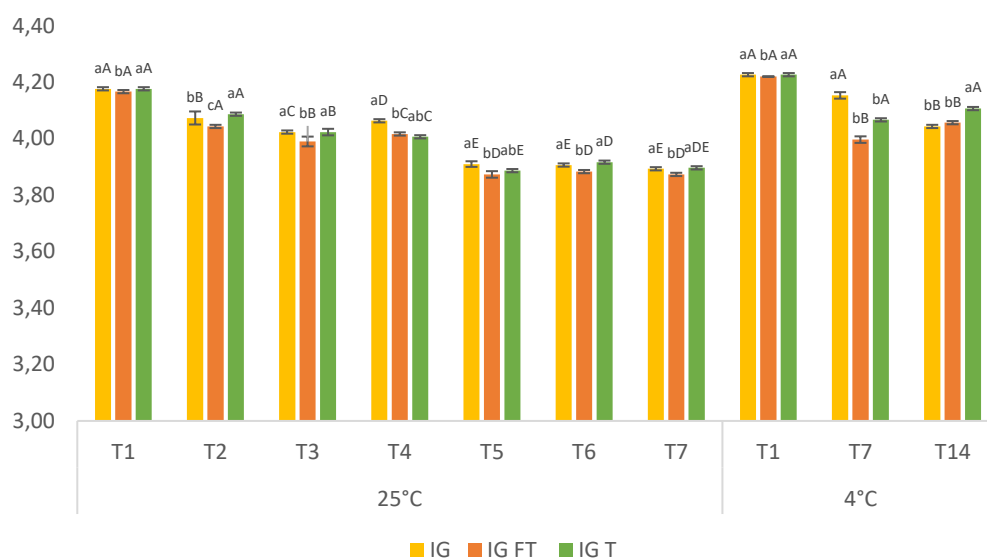


Figura 2. Perfil de pós acidificação dos iogurtes elaborados ao longo do armazenamento a 25°C e 4°C. Onde: IG: iogurte controle; IG FT: iogurte fermentado com triptofano; IG T: iogurte adicionado de triptofano. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os iogurtes em um mesmo dia. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) do mesmo produto ao longo do armazenamento (25° ou 4°C). N=3.

4.4. Viabilidade das culturas fermentadoras

As culturas utilizadas para a fermentação dos iogurtes, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, foram avaliadas quanto a sua população ao longo do armazenamento dos produtos a 25°C e 4°C. Os resultados obtidos estão representados na Figura 2.

A redução expressiva que pode ser observada quanto a viabilidade das culturas fermentadoras, de forma geral, presentes nos iogurtes que permaneceram armazenados a 25°C, era esperada e se deve por nessa temperatura o metabolismo das bactérias permanecer mais ativo do que quando comparado ao armazenamento refrigerado, quando as funções metabólicas das bactérias diminuem para evitar gasto de energia (Piazzentin *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Logo, todos os processos provenientes da fermentação, como a queda do pH e produção de metabólitos, continuam e seu efeito sobre as bactérias se intensificam no decorrer do armazenamento, o que, neste trabalho, nos permite observar a influência da presença do triptofano em condições que levariam mais tempo para ocorrer nos iogurtes armazenados a 4°C.

A população de *S. thermophilus* nos iogurtes armazenados a 25°C, reduziu de forma significativa ($P \leq 0,05$) a partir do 4° dia de armazenamento, quando os produtos apresentaram uma diferença de cerca de 0,30 log UFC/mL da viabilidade inicial (T1) do ensaio. Decréscimos

significativos ($P \leq 0,05$) na população de *S. thermophilus* também podem ser observados no 5° e 6° dia de armazenamento a 25°C nos iogurtes, chegando ao final do ensaio (T7) apresentando viabilidade de 6,47 (IG), 6,59 (IG FT) e 6,81 (IG T) log UFC/mL. Essa diminuição expressiva na viabilidade de *S. thermophilus* nesses produtos, se deve, principalmente, a sua pouca tolerância a pH mais baixos observados nos iogurtes armazenados a 25°C (Dualdo *et al.*, 2010; Silva *et al.* 2020).

O contrário pode ser observado quanto a população de *S. thermophilus* nos iogurtes armazenados a 4°C, onde a viabilidade da bactéria apresenta maior estabilidade ao longo do período analisado, exibindo diferença significativa ($P \leq 0,05$) apenas no 14° dia de armazenamento nos produtos IG e IG FT, com redução de 0,21 log UFC/mL na população da bactéria quanto ao início do experimento. O iogurte adicionado de triptofano após a fermentação (IG T) armazenado a 4°C, não apresentou diferença significativa na viabilidade de *S. thermophilus* durante o período de armazenamento. A estabilidade da população de *S. thermophilus* em lácteos fermentados ao longo do armazenamento refrigerado está de acordo com o relatado em outros estudos (Mousavi *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020).

Os iogurtes fermentados com a adição de triptofano (IG FT), apresentaram a população de *L. bulgaricus* significativamente ($P \leq 0,05$) menor em ambas as temperaturas de armazenamento (25°C e 4°C), do que nos demais produtos (IG e IG T), ao longo de todo o período de análise. Após o final da fermentação, logo no 1° dia de armazenamento, o iogurte fermentado com triptofano apresentou viabilidade entre 0,13 e 0,18 log UFC/mL, mais baixo que o iogurte controle (IG) e o iogurte adicionado de triptofano (IG T), que iniciaram o experimento apresentando 8,63 e 8,68 log UFC/mL, respectivamente.

Esses resultados reforçam a influência negativa da presença do triptofano no crescimento de *L. bulgaricus* em meio de cultivo contendo diferentes açúcares, com e sem adição de triptofano, descrita no item 4.1. deste estudo. Uma vez que esse trabalho também levantou a possibilidade de metabolização do triptofano ao longo da fermentação pelas outras duas culturas utilizadas, *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, os possíveis compostos produzidos como resultado deste processo podem ter prejudicado o desenvolvimento do *L. bulgaricus* durante a fermentação do iogurte. Isso, porque os compostos produzidos pela metabolização bacteriana do triptofano, principalmente derivados do ácido indol, podem exercer efeito bacteriostático e são produzidos para auxiliar na competição entre as bactérias (Gao *et al.* 2018).

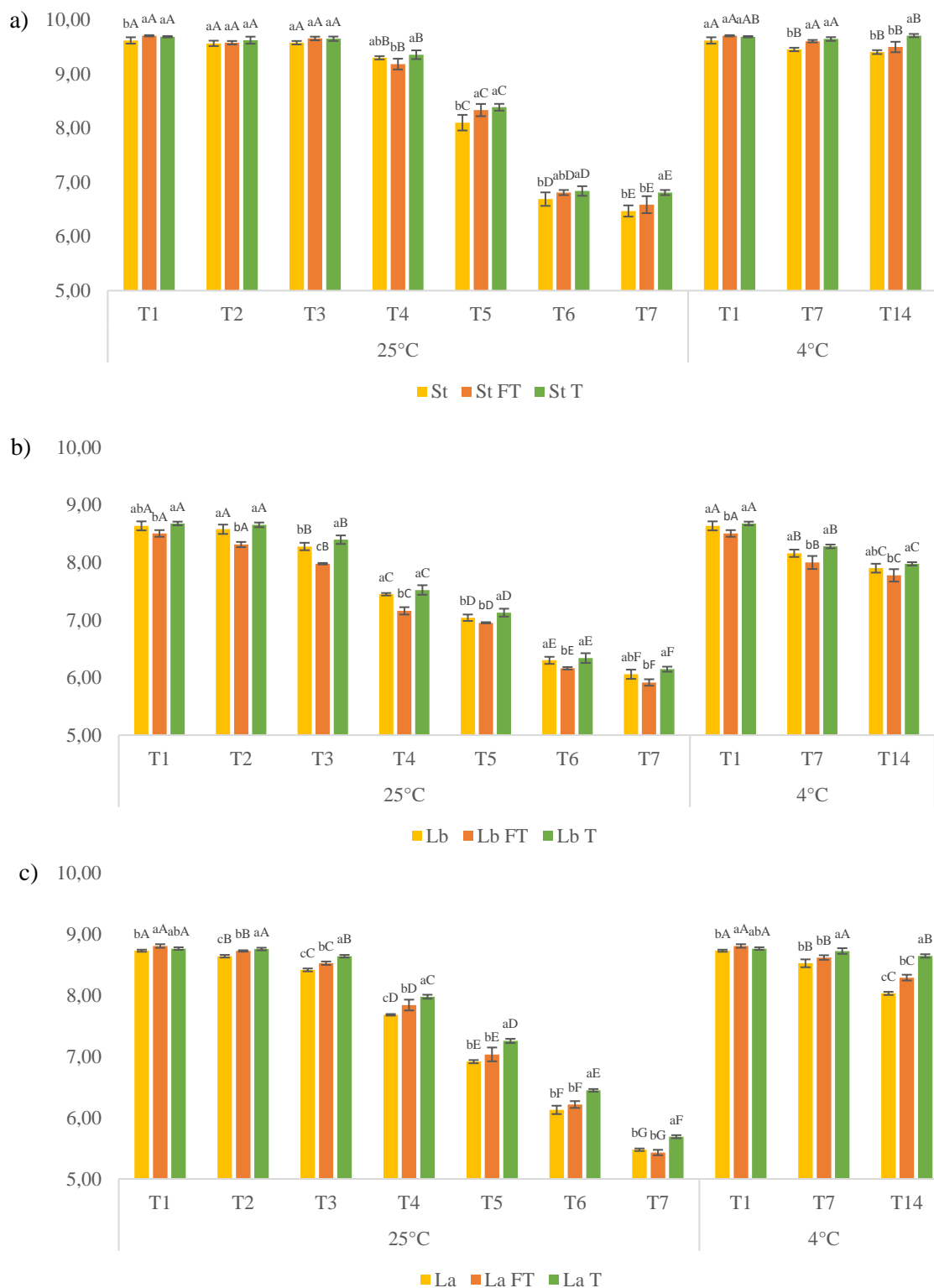


Figura 3. Viabilidade das culturas fermentadoras nos iogurtes ao longo do armazenamento a 25°C e 4°C. Onde: a) *S. thermophilus* (St); b) *L. bulgaricus* (Lb); c) *L. acidophilus* (La). Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os iogurtes em um mesmo dia. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) do mesmo produto ao longo do armazenamento. N=3.

No decorrer do armazenamento a 25°C e 4°C, *L. acidophilus* apresentou redução gradativa de sua população, o que pode ser observado de forma mais expressiva nos iogurtes controle (IG). Essa diminuição da viabilidade de *L. acidophilus* é comumente relatada em produtos lácteos e é ocasionada pelo aumento da acidez nos produtos ao longo de sua vida de prateleira (Dave & Shah, 1997; Silva *et al.*, 2020). Dessa forma, os iogurtes armazenados a 25°C, que apresentaram uma pós acidificação mais acelerada, chegando ao final do 7º dia de armazenamento com pH em torno de 3,90, como descrito no item 4.3., exibiram redução significativa ($P \leq 0,05$) da população de *L. acidophilus* a partir do 2º (IG e IG FT) e 4º (IG T) dia de armazenamento, chegando ao final do período de análise (T7) com viabilidade de 5,48 (IG), 5,43 (IG FT) e 5,69 (IG T) log UFC/mL.

A presença do triptofano nos iogurtes influenciaram de forma benéfica a viabilidade de *L. acidophilus* em ambas as temperaturas de armazenamento, porém, de forma mais perceptível nos produtos armazenados a 4°C. Nesta temperatura, os iogurtes adicionados de triptofano (IG FT e IG T) apresentaram população significativamente ($P \leq 0,05$) maior do que o iogurte controle (IG), exibindo, ao final do período de 14 dias de armazenamento, viabilidade de 9,50, 9,71 e 9,41 log UFC/mL, respectivamente. A adição do triptofano nos iogurtes após a fermentação, exerceu um efeito melhor na estabilidade da viabilidade de *L. acidophilus* nos iogurtes mantidos sob refrigeração (IG T), que apresentaram a redução não significativa ($P \geq 0,05$) de 0,12 log UFC/mL de sua população ao longo de 14 dias de armazenamento.

Silva (2015) também observou aumento na viabilidade de *L. acidophilus* ao longo do armazenamento refrigerado em bebidas lácteas, com diferentes combinações de polpa de fruta, quando adicionadas de triptofano. Da mesma forma que *L. acidophilus* apresentou melhor desenvolvimento nos meios adicionados do aminoácido, observado no item 4.1., a estabilidade de sua população nos iogurtes pode estar associada com a capacidade do probiótico de metabolizar o triptofano, podendo estar lentamente utilizando-o como substrato para manutenção de sua viabilidade ao longo do armazenamento (Zelante *et al.*, 2013).

Sendo assim, a adição do triptofano a iogurtes e outros lácteos fermentados probióticos, pode contribuir, não só na suplementação do aminoácido na dieta do consumidor, como também, possivelmente, promover benefícios a cultura probiótica, podendo talvez permitir uma maior viabilidade da mesma e, conseqüentemente, aumento da vida de prateleira do produto.

4.5. Contagem de células totais por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para verificar os possíveis efeitos que a adição do triptofano poderia causar as estruturas celulares das culturas fermentadoras utilizadas como danos, mortes, assim como, as células vivas presentes nos iogurtes. Nesse ensaio não houve

isolamento das bactérias lácticas empregadas na fermentação, sendo assim, os valores das células vivas, danificadas e mortas, apresentados na Tabela 3, são referentes a quantidade total das bactérias *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* presentes nos produtos.

Quanto ao número de células vivas de bactérias totais, podemos observar que os iogurtes adicionados de triptofano (IG FT e IG T) apresentaram viabilidades significativamente ($P \leq 0,05$) maiores quando comparados com o iogurte controle (IG), principalmente ao final de 8 dias de armazenamento a 25°C e 10 dias de armazenamento a 4°C.

Os iogurtes armazenados a 25°C apresentaram redução significativa ($P \leq 0,05$) do número de células vivas entre o 1° e o 4° dia de análise, com decréscimos de 0,39 (IG), 0,34 (IG FT) e 0,35 (IG T) nesse período. No 8° dia de armazenamento a 25°C, foi observado um aumento no número de células vivas em todos os iogurtes analisados, que apresentaram uma diferença de 0,21 (IG), 0,09 (IG FT) e 0,30 (IG T) log entre os períodos. Comportamento semelhante também é relatado por Mahmood et al. (2019) e Silva et al. (2020), na avaliação da viabilidade de culturas fermentadoras por plaqueamento, porém geralmente observado em torno do 14° dia de armazenamento refrigerado de produtos lácteos. Os autores, em ambos os estudos, associam o aumento da viabilidade das culturas fermentadoras a presença de *L. acidophilus* e sua capacidade de conferir maior atividade proteolítica, podendo favorecer o crescimento das demais bactérias presentes nos produtos.

Quanto aos iogurtes armazenados a 4°C, é possível observar que todos os produtos apresentaram diminuição do número de células vivas ao longo do armazenamento, exibindo diferença de 0,17 e 0,18 log para IG e IG FT, respectivamente, e 0,07 log para IG T, entre o 1° e o 14° dia de análise. O iogurte adicionado de triptofano (IG T) foi o que apresentou menor redução no número de células vivas durante o armazenamento refrigerado, não exibindo diferença estatística ($P \geq 0,05$) quando comparado ao início do experimento. Assim como observado na avaliação da viabilidade individual das culturas fermentadoras por plaqueamento, descrito no item 4.5., o triptofano pode estar sendo metabolizado lentamente pelas bactérias para a manutenção de sua viabilidade (Zelante *et al.*, 2013).

Quanto ao total de células danificadas, o iogurte controle (IG), mantido a 25°C durante o experimento, apresentou aumento significativo ($P \leq 0,05$) no número de células danificadas, chegando a 9 log ao final de 8 dias de armazenamento. Em contrapartida, os iogurtes contendo triptofano (IG FT e IG T), mesmo apresentando entre 8,95 e 9,01 log de células danificadas ao final do período de armazenamento a 25°C, não exibiram diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre o 1° e o 8° dia de análise. Da mesma forma que pode estar ocorrendo o consumo do triptofano para a manutenção da viabilidade, os metabólitos produzidos nesse processo podem estar exercendo um efeito protetivo com relação a algumas bactérias, uma vez que a produção de alguns

compostos durante a metabolização do triptofano são produzidos para favorecer as bactéria produtoras frente a competição com outros microrganismos (Gao *et al.*, 2018). Isso é reforçado por Shi, et al. (2020), que observaram em seu estudo efeitos protetivos dos metabólitos produzidos pela associação do triptofano com *L. plantarum* KLDS 1.0386 em ratos colite ulcerativa.

Tabela 3. Contagem de bactérias totais por citometria de fluxo dos iogurtes ao longo do armazenamento a 25°C e 4°C.

Produto	Armazenamento 25°C			Armazenamento 4°C		
	T1	T4	T8	T1	T5	T10
Células vivas						
IG	9,35±0,01 ^{ba}	8,96±0,01 ^{bb}	9,17±0,00 ^{ca}	9,35±0,05 ^{ba}	9,25±0,01 ^{bb}	9,18±0,02 ^{bc}
IG FT	9,47±0,00 ^{aa}	9,13±0,00 ^{ab}	9,22±0,03 ^{bb}	9,47±0,00 ^{aa}	9,32±0,00 ^{ab}	9,29±0,02 ^{ab}
IG T	9,35±0,02 ^{ba}	9,00±0,02 ^{ab}	9,30±0,01 ^{aa}	9,35±0,01 ^{ba}	9,30±0,00 ^{aa}	9,28±0,01 ^{aa}
Células danificadas						
IG	8,83±0,03 ^{bb}	8,77±0,01 ^{bc}	9,00±0,00 ^{aa}	8,83±0,00 ^{bc}	8,97±0,01 ^{aa}	8,90±0,00 ^{bb}
IG FT	9,02±0,00 ^{aa}	8,84±0,01 ^{ab}	9,01±0,01 ^{aa}	9,02±0,01 ^{aa}	8,96±0,00 ^{ab}	8,97±0,00 ^{ab}
IG T	8,83±0,01 ^{ba}	8,66±0,02 ^{cb}	8,95±0,01 ^{ba}	8,83±0,00 ^{bb}	8,78±0,01 ^{bc}	8,88±0,01 ^{ba}
Células mortas						
IG	7,92±0,00 ^{ab}	8,47±0,01 ^{ba}	8,51±0,00 ^{ba}	7,92±0,02 ^{ab}	8,28±0,00 ^{aa}	8,25±0,00 ^{aa}
IG FT	7,83±0,02 ^{bc}	8,20±0,01 ^{bb}	8,55±0,00 ^{aa}	7,83±0,01 ^{bc}	8,08±0,02 ^{bb}	8,22±0,01 ^{ba}
IG T	7,92±0,01 ^{ac}	8,43±0,00 ^{ab}	8,55±0,02 ^{aa}	7,92±0,01 ^{ab}	8,30±0,01 ^{aa}	8,27±0,02 ^{aa}

N=3. Onde: IG: iogurte controle; IG FT: iogurte fermentado com triptofano; IG T: iogurte adicionado de triptofano. Letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os iogurtes em um mesmo dia. Letras maiúsculas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) do mesmo produto ao longo do período de análise (25°C ou 4°C).

Para as amostras armazenadas a 4°C, o total de células danificadas foi significativamente ($P \leq 0,05$) maior no iogurte fermentado com triptofano (IG FT), quando comparado com os demais produtos analisados, apresentando 0,07 e 0,09 log a mais que o iogurte controle (IG) e o iogurtes adicionado de triptofano (IG T), respectivamente. Assim como alguns compostos produzidos

através da metabolização do triptofano podem apresentar um efeito protetivo quanto suas bactérias produtoras, podem exercer um efeito antimicrobiano ou bacteriostático contra as demais bactérias competidoras (Gao *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). Esse resultado reforça o efeito negativo que a presença do triptofano durante a fermentação influiu na população de *L. bulgaricus* do iogurte observado na avaliação de sua viabilidade por plaqueamento, descrito no item 4.5.

Assim, como o número maior de células vivas foi observado nas amostras de iogurtes adicionados de triptofano (IG T), o contrário foi observado quanto as células danificadas, que foram encontradas em menor número nos produtos ao final do período de armazenamento, tanto a 25°C quanto a 4°C, novamente, reforçando a possível capacidade protetiva do triptofano com relação a algumas células (Zelante *et al.* 2013; Shi *et al.* 2020).

O total de células mortas presentes nos os iogurtes armazenados a 25°C apresentaram aumento significativo ($P \leq 0,05$) ao longo do período de análise, exibindo diferença de 0,59 (IG), 0,72 (IG FT) e 0,63 (IG T) log entre o 1° e o 8° dia de armazenamento. Esse aumento expressivo no número de células mortas era esperado, uma vez que, como já mencionado, nessa temperatura as bactérias presentes nos iogurtes continuam com suas funções metabólicas mais ativas, consumindo os substratos e, conseqüentemente, acidificando os produtos, o que contribui para diminuição mais acelerada da viabilidade e, com isso, para o aumento das células mortas (Zelante *et al.* 2013; Bertazzo *et al.* 2016; Piazzentin *et al.*, 2020). Quando comparados, é possível observar que o iogurte controle (IG) foi o produto que apresentou a menor quantidade de células mortas ao longo do período de armazenamento tanto para as amostras armazenadas a 25°C, seguido pelos produtos contendo triptofano (IG FT e IG T), que não apresentaram diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre si.

Os iogurtes que receberam adição de triptofano (IG T) e que permaneceram armazenados a 4°C, apresentaram o total de células mortas de 8,27 log no 10° dia de armazenamento, não diferenciando estatisticamente ($P \geq 0,05$) do iogurte controle (IG), que exibiu 8,25 log de células mortas ao final do mesmo dia de análise. Embora o iogurte fermentado com triptofano (IG FT) tenha apresentado um número aproximado, porém menor, de células mortas ao final do experimento (8,22 log), essa diferença não foi significativa ($P \geq 0,05$) quando comparada com os demais produtos.

Dessa forma, a contagem de células totais por citometria de fluxo nos permitiu observar a influência da presença do triptofano na estrutura celular das bactérias lácticas utilizadas na elaboração dos iogurtes, que, ao ser adicionado após a fermentação, possibilitou aumento das células vivas, redução dos danos as culturas e não afetando diretamente a morte celular.

4.6. Quantificação do teor de Triptofano nos iogurtes

O teor de triptofano foi avaliado nos iogurtes que foram suplementados com 0,5% (m/v) do aminoácido antes (IG FT) e após (IG T) a fermentação, bem como dos iogurtes utilizados como controle (IG). A Figura 4 mostra as quantificações do triptofano nos dias 1, 7 e 14 de armazenamento refrigerado a 4°C e após 1 e 7 dias de armazenamento a 25°C.

Com os resultados obtidos, é possível observar os iogurtes controle (IG) apresentaram teor de 160 mg/L de triptofano, que se manteve estável durante todo o período de análise em ambas as temperaturas de armazenamento (25°C e 4°C). A presença de triptofano no iogurte mesmo sem suplementação já era esperado, uma vez que o leite apresenta naturalmente esse aminoácido em sua composição (Nongonierma & FitzGerald, 2015). O estudo realizado por Bertazzo et al. (2016) avaliou a presença de triptofano em bebidas lácteas probióticas e as mesmas apresentam maiores concentrações de triptofano do que quando comparados com o leite, indicando que o oferta de triptofano pode ser maior em bebidas fermentadas do que no leite *in natura*.

De forma geral, podemos observar que os iogurtes fermentados com triptofano (IG FT) apresentaram menores quantidades do aminoácido quando comparados com os iogurtes em que o triptofano foi adicionado após a fermentação. Essa diferença pode estar relacionada com a capacidade já relatada das bactérias, principalmente as que compõe a nossa microbiota, de metabolizar o triptofano em outros compostos como indol, indol ácido propiônico, indol ácido acético, escatol e triptamina, podendo utilizar o aminoácido como substrato ao longo da fermentação (Gao *et al.*, 2018).

O teor de triptofano exibido pelos iogurtes que receberam a suplementação do aminoácido após a fermentação (IG T) se manteve mais estável ao longo do armazenamento em ambas as temperaturas (25° e 4°C). Enquanto o iogurte controle (IG) mostrou uma diferença de apenas 2 mg/L entre o início e o final do armazenamento refrigerado, os iogurtes adicionados de triptofano que foram armazenados a 4°C apresentaram redução de 9 mg/L no teor deste aminoácido ao longo dos 14 dias de análise, enquanto o iogurte fermentado com triptofano (IG FT) exibiu decréscimo significativo ($P \leq 0,05$) de 63 mg/L ao final do mesmo período após armazenamento refrigerado, tendo os produtos apresentado teor de 162 mg/L (IG), no último dia de análise. Isso indica que, mesmo sob refrigeração, pode estar havendo o consumo do triptofano pelas culturas fermentadoras presentes no iogurte, logo, a redução mais expressiva no teor de triptofano nos iogurtes que foram fermentados com ele, pode indicar que a presença do aminoácido desde o início da fermentação, pode ter influenciado para que o metabolismo das bactérias lácticas se mostrasse mais ativo ao longo do armazenamento (Gummalla & Broadbent, 1999). O potencial dos *Lactobacillus* spp. de metabolizar o triptofano, é relatada por Zelante et al. (2013), que

demonstraram a capacidade de uma cepa de *L. acidophilus*, isolada de vagina, de consumir o triptofano para a produção de metabólitos.

Os iogurtes que permaneceram armazenados a 25°C ao longo do período de análise, apresentaram redução significativa ($P \leq 0,05$) nas quantidades de triptofano, exibindo ao final do 7º dia de armazenamento o teor de 149 mg/L (IG), 572 mg/L (IG FT) e 597 mg/L (IG T), significando decréscimo de 17 mg/L, 10 mg/L e 62 mg/L, respectivamente, com relação ao 1º dia de análise. Ao passo que o iogurte IG FT apresentou melhor estabilidade quanto ao seu teor de triptofano, foi observada diminuição no teor de triptofano dos iogurtes IG e IG T, consideravelmente maior do que os mesmos produtos apresentaram ao final do armazenamento refrigerado. Isso pode estar associado a temperatura de armazenamento, uma vez que a 25°C o metabolismo das bactérias encontrasse mais ativo do que quando sob refrigeração (4°C), onde a atividade metabólica das bactérias se encontra reduzida para conservação de energia (Bertazzo *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2020; Piazzentin *et al.*, 2020).

Diante dos resultados obtidos e tendo como base a necessidade da refrigeração na comercialização dos iogurtes, bem como de outros produtos lácteos fermentados, a suplementação de triptofano ao produto após a fermentação, possibilita maior teor do aminoácido ao final da vida de prateleira do produto e melhor estabilidade durante o armazenamento refrigerado, sendo a opção mais viável para veicular o triptofano e contribuir para sua complementação na dieta do consumidor.

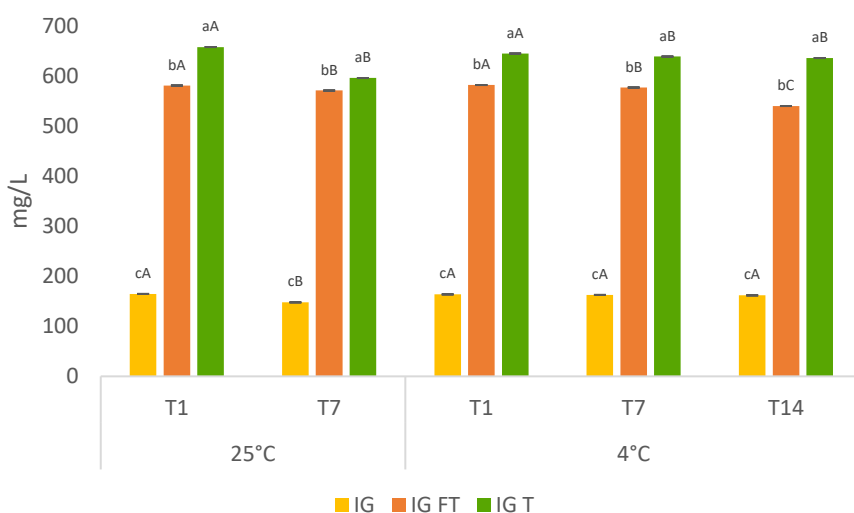


Figura 4. Quantificação do triptofano nos iogurtes adicionados de triptofano e seu controle após 1 e 7 dias de armazenamento a 25°C e 1, 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 4°C. Onde: IG: iogurte controle; IG FT: iogurte fermentado com triptofano; IG T: iogurte adicionado de triptofano. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os iogurtes em um mesmo dia. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) do mesmo produto ao longo do armazenamento (25°C ou 4°C). N=3.

5. CONCLUSÕES

A presença do triptofano no meio de cultivo contendo glucose, influenciou de forma positiva o crescimento de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, contribuindo para o melhor desenvolvimento das bactérias ao longo da fermentação.

Todas as culturas fermentadoras avaliadas, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, apresentaram atividade antilistérica com a produção de compostos antimicrobianos. A adição de triptofano aos meios de cultivos, aumentou a atividade apresentada por *S. thermophilus*, bem como, incentivou sua atividade no meio de cultivo M17.

A adição do triptofano após a fermentação não influenciou no perfil de pós acidificação dos iogurtes quando comparados ao controle. Já os iogurtes fermentados com o triptofano, exibiram valores de pH mais baixos ao longo do armazenamento em ambas as temperaturas de 25°C e 4°C.

Os iogurtes adicionados de triptofano, principalmente após a fermentação, apresentaram maior viabilidade do probiótico *L. acidophilus* durante o armazenamento, tanto a 25°C quanto a 4°C, indicando que a presença do aminoácido pode promover benefícios a cultura probiótica, permitindo melhor viabilidade da bactéria e, assim, maior tempo de vida de prateleira ao produto probiótico.

Através da contagem de células totais por citometria de fluxo, foi possível observar que a presença do triptofano, ao ser adicionado após a fermentação, promoveu aumento das células vivas, menor dano as bactérias e não afetou de forma direta a morte celular.

Além de proporcionar maiores benefícios as culturas fermentadoras, a suplementação dos iogurtes com o triptofano após a fermentação, permitiu que houvesse maior teor do aminoácido ao final do tempo de armazenamento do produto e que este apresentasse melhor estabilidade, principalmente durante o armazenamento refrigerado.

Sendo assim, diante dos resultados obtidos ao longo do estudo, é possível concluir que a suplementação do triptofano em produtos lácteos probióticos após a fermentação, pode contribuir para a complementação do aminoácido na dieta do consumidor e, adicionalmente, influir de forma benéfica quanto a viabilidade das culturas probióticas utilizadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN, I. M., MORETRO, T., KATLA, T., AXELSSON, L., STORRO, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 159-166, 2000.
- ABBASILIASI, S., TAN, J. S., IBRAHIM, T. A. T., BASHOKOUH, F., RAMAKRISHNAN, N. R., MUSTAFA, S., ARIFF, A. A. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. **RSC Advances**, v. 7, p. 2939-29420, 2017.
- ANDRADE, K. D. **Qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) suplementada com selênio**. Macaíba, 2015. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produção Animal – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- ARIOLI, S.; SCALA, G. D.; REMAGNI, M. C.; STUKNYTE, M. COLOMBO, S.; GUGLIEMETTI, S.; NONI, I.; RAGG, E.; MORA, D. *Streptococcus thermophilus* urease activity boosts *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* homolactic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 2016.
- AVONTS, L., VAN UYTEN, E., DE VUYST, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **International Dairy Journal**, v.14, n. 11, p. 947-955, 2004.
- BERTAZZO, A., RAGAZZI, E., VISIOLI, F. Evolution of tryptophan and its foremost metabolites' concentrations in milk and fermented dairy products. **PharmaNutrition**, v. 4, p. 62-67, 2016.
- CAPUCHINHO, L. C. F. M. **Efeito da concentração de soro e da adição de culturas na sinérese e pós-acidificação de bebida láctea fermentada**. Montes Claros, 2018. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- CARVALHO-SANTOS, J.; QUEIRÓS-SANTOS, A.; MORAIS, G.L.; SANTANA, L.H.S.; BRITO, M.G.; ARAÚJO, R.C.S.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; DEIRÓ, T.C.B.J.; BARRETO-MEDEIROS, J.M. Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 503-511, 2010.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31 – 41, 1996.
- DE VUYST, L. Nutrition a I factors affect i ng n is i n production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 28-33, 1995.
- DUALDO, L. C. S.; CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema compact dry® tc durante estocagem refrigerada de iogurtes. **Rev. Inst. Latic.** n. 374, v. 65, p. 33-40, 2010.
- FEIJÓ, F.M.; BERTOLUCI, M.C.; REIS, C. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, p. 74-77, 2011.

- GAO, J., XU, K., LIU, H., LIU, G., BAI, M., PENG, C., LI, T., YIN, Y. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1-22, 2018.
- GAO, K., MU, C-L., FARZI, A., ZHU, W-Y. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. **Advance Nutrition**, v. 11, p. 709-723, 2020.
- GASPAR, C., DONDEERS, G. G., PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R., QUEIROZ, J. A., TOMAZ, C., MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J., PALMEIRA DE OLIVEIRA, A. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. **AMB Express**, v.8, n, 153, p 1-8, 2018.
- GERALDI, M. V.; TILINI, F. L.; SOUZA, V. M.; DE MARTINS, E. C. Development of Yoghurt with Juçara Pulp (*Euterpe edulis* M.) and the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* La5. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, v. 10, p. 71-76, 2018.
- GUMMALLA, S., BROADBENT, J.R. Tryptophan Catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* Cheese Flavor Adjuncts. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n.10, p. 2070-2077, 1999.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B., MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 11, 506 – 514, 2014.
- IVANOVA, I., MITEVA, V., STEFANOVA. TS., PANTEV, A., BUSAKOV, I., DANOVA, S., MONCHEVA, P., NIKOLOVA, I., DOUSSET, X., BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 147-158, 1998.
- KIM, H-J., KIM, J-H., SON, J. H., SEO, H-J., PARK, S-J., PAEK, N-S., KIM, S-K. Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 503-508, 2004.
- MAHMOOD, T., MASUD, T., ALI, S., ABBASI. K. S., LIAQUAT, M. Optimization and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus* -TLBFT06 isolated from Dahi. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 549-555, 2015.
- MARTÍN, R., SUÁREZ, J. E. Biosynthesis and Degradation of H₂O₂ by Vaginal Lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 400-405, 2010.
- MORACANIN, S. M. V., DUKIC, D. A., MEMISI, N, R. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria – a review. **APTEFF**, v. 45, p. 271-283, 2014.
- MOUSAVI, M.; HESHMATI, A.; GARMAKHANY, A. D.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 102, p. 80 – 88, 2019.
- NONGONIERMA, A.B., FITZGERALD, R.J. Milk proteins as a source of tryptophan-containing bioactive peptides. **Food & Function**, v. 6, p. 2115-2127, 2015.

- O'HANLON, D. E., MOENCH, T. R., CONE, R., A. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80074, 2013.
- O'MAHONY, S.M., CLARKE, G., BORRE, Y.E., DINAN, T.G., CRYAN, J.F. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 32–48, 2015.
- PALEGO, L.; BETTI, L.; ROSSI, A.; GIANNACCINI, G. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. **Journal of Amino Acids**, 2016.
- PIAZENTIN, A. C. M. (2016). **Efeito da cultura probiótica em fermentado a base de soja: resistência ao armazenamento refrigerado, ao estresse gastrointestinal in vitro e atividade antimicrobiana**. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- PIAZENTIN, A.C.M., da SILVA, T.M.S., FLORENCE-FRANCO, A.C., BEDANI, R., CONVERTI, A., OLIVEIRA, R.P.S. Soymilk fermentation: effect of cooling protocol on cell viability during storage and in vitro gastrointestinal stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1645-1654, 2020.
- ROSSI, F., MARZOTTO, M., CREMONESE, S., RIZZOTTI, L., TORRIANI, S. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. **Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 27-33, 2013.
- SHI, J., DU, P., XIE, O., WANG, N., LI, H., SMITH, E.E., LI, C., LIU, F., HUO, G., LI, B. Protective effects of tryptophan-catabolizing *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0386 against dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Food & Function**, v. 11, p. 10736-10747, 2020.
- SILVA, T. M. S. **Comportamento do ácido elágico em bebidas lácteas simbióticas suplementadas com L-triptofano e polpa de frutas vermelhas durante armazenamento refrigerado**. São Paulo, 2015. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- SILVA, T. M. S.; PIAZENTIN, A. C. M.; MENDONÇA, C. M. N.; CONVERTI, A.; BOGSAN, C. S. B.; MORA, D.; OLIVEIRA, R. P. S. Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, n. 9, 2020.
- SIMOVA, E. D., BESHKOVA, D. M., ANGELOV, M. P., DIMITROV, ZH. P. Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 559-567, 2008.
- SØRENSEN, K.I., CURIC-BAWDEN, M., JUNGE, M.P., JANZEN, T., JOHANSEN, E. Enhancing the Sweetness of Yoghurt through Metabolic Remodeling of Carbohydrate Metabolism in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 12, 2016.
- SOUZA, F.S.; COCCO, R.R.; SARNI, R.O.S.; MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamentos de doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.1, p.86-97, 2010.

TABASCO, R., GARCÍA-CAYUELA, T., PELÁEZ, C., REQUENA, T., *Lactobacillus acidophilus*La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 109-116, 2009.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 41, n. 03, 2005.

VILLANI, F., PEPE, O., MAURIELLO, G., SALZANO, G., MOSCHETTI, G., COPPOLA, S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p. 179-190, 1995.

ZANELLO, D.R.P. **Efeitos do l-triptofano sobre ansiedade, compulsão e escolha alimentar**. Brasília, 2012. Trabalho de Conclusão de Curso – Nutrição – Centro Universitário De Brasília, Faculdade De Ciências Da Educação E Saúde.

ZELANTE, T., IANNITTI, R.G., CUNHA, C., De LUCA, A., GIOVANNINI, G., PIERACCINI, G., ZECCHI, R., D'ANGELO, C., MASSI-BENEDETTI, C., FALLARINO, F., CARVALHO, A., PUCETTI, P., ROMANI, L. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 372-385, 2013.

CONCLUSÕES FINAIS

A utilização do leite de búfala na elaboração das bebidas lácteas probióticas apresentou benefícios quanto as culturas fermentadoras (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*) presentes nos produtos, exercendo efeito protetivo capaz de influir na preservação da viabilidade das bactérias ao longo do período de armazenamento refrigerado e, possivelmente, promover maior sobrevivência as condições associadas ao estresse gastrointestinal.

Os resultados obtidos mostraram que é possível a utilização de 25% de soro de leite na elaboração das bebidas lácteas bubalinas sem que haja alteração considerável na pós-acidificação, viabilidade e quanto a capacidade de sobrevivência ao estresse gastrointestinal *in vitro* das bactérias lácticas.

A adição do preparado de polpa de morango às bebidas lácteas bubalinas, contribuiu para obtenção de produtos com menor teor de gordura, sem afetar de forma significativa a pós-acidificação, o perfil de ácido graxo, a viabilidade e resistência ao estresse gastrointestinal *in vitro* das culturas fermentadoras, além de proporcionar melhores parâmetros reológicos, com aumento da viscosidade e consistência dos produtos.

A avaliação do efeito e da possibilidade da suplementação do triptofano em lácteos fermentados, foi avaliada inicialmente em iogurtes probióticos. A adição de triptofano após a fermentação dos iogurtes, que foram armazenados sob refrigeração (4°C), não afetou a pós-acidificação dos produtos, apresentando efeitos benéficos quanto a viabilidade do probiótico *L. acidophilus*, redução do dano e aumento do número de células vivas, além de permitir maiores teores do aminoácido nos iogurtes, sem apresentar redução significativa ao longo do armazenamento.

Por fim, a adição de triptofano em meios de cultivo influenciou de forma positiva o crescimento de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, influenciando no melhor desenvolvimento das bactérias durante a fermentação e promovendo maior atividade antilistérica por parte do *S. thermophilus*.

Em vista da influência positiva que uso de leite de búfala na elaboração das bebidas lácteas, assim como, a adição do triptofano em iogurtes probióticos, proporcionou aos produtos e a cultura probiótica *L. acidophilus*, a suplementação do aminoácido em bebidas lácteas bubalinas frutadas permitiria a obtenção de um produto, cujo os benefícios, poderia se estender além dos associados ao consumo de lácteos probióticos, promovendo a complementação de triptofano na dieta do consumidor e, com isso, ampliando a funcionalidade do produto.