



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO AMAPÁ  
*CAMPUS* MACAPÁ  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

CÁSSIA ADRIA MEDEIROS DA SILVA  
VALÉRIA COUTINHO DIAS

**PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS:**

Avaliação do Efeito da Suplementação com Frutooligossacarídeos (FOS) Sobre Cinética de  
Fermentação de Leite de Búfala

MACAPÁ - AP  
2021

CÁSSIA ADRIA MEDEIROS DA SILVA  
VALÉRIA COUTINHO DIAS

**PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS:**

Avaliação do Efeito da Suplementação com Frutooligossacarídeos (FOS) Sobre Cinética de  
Fermentação de Leite de Búfala

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Superior de Tecnologia em Alimentos, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá – IFAP, como requisito avaliativo para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Dr. Victor Hugo Gomes Sales

Coorientadora: Dra. Ana Caroline de Oliveira

Biblioteca Institucional - IFAP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

- S586p Silva, Cássia Adria Medeiros da  
Probióticos e Prebióticos: Avaliação do Efeito da Suplementação com Frutooligossacarídeos (FOS) Sobre Cinética de Fermentação de Leite de Búfala / Cássia Adria Medeiros da Silva, Valéria Coutinho Dias. - Macapá, 2021.  
48 f.: il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá, Campus Macapá, Curso de Tecnologia em Alimentos, 2021.
- Orientadora: Dr. Victor Hugo Gomes Sales.  
Coorientadora: Dra. Ana Caroline de Oliveira.
1. Probióticos. 2. Frutooligossacarídeos. 3. Leite de Búfala. I. Dias, Valéria Coutinho. I. Sales, Dr. Victor Hugo Gomes, orient. II. Oliveira, Dra. Ana Caroline de, orient. III. Título.

---

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica do IFAP com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CÁSSIA ADRIA MEDEIROS DA SILVA  
VALÉRIA COUTINHO DIAS

**PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS:**

Avaliação do Efeito da Suplementação com Frutooligossacarídeos (FOS) Sobre Cinética de Fermentação de Leite de Búfala

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Superior de Tecnologia em Alimentos, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá – IFAP, como requisito avaliativo para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Dr. Victor Hugo Gomes Sales

Coorientadora: Dra. Ana Caroline de Oliveira

**BANCA EXAMINADORA**



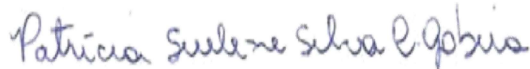
---

Prof. Dr. Victor Hugo Gomes Sales  
Orientador, IFAP (Presidente)



---

Profª. Dra. Ana Caroline de Oliveira  
Co-orientadora, IFAP



---

Profª. Dra. Patrícia Suelene Silva Costa Gobira  
Examinadora interna, IFAP

Aprovado em: 31 / 03 / 2021

Nota: 10,0

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Vitor Hugo Gomes Sales, por ter aceitado ser orientador deste trabalho.

A Professora Dra. Ana Caroline de Oliveira, que sempre nos incentivou, nos manteve positivas, e acompanhou cada etapa, mostrando as direções que possibilitaram para que este trabalho chegasse ao seu término.

A minha mãe, Cídea dos Santos Medeiros, por todo o apoio no percurso do curso.

Agradeço ao Anderson Ferreira e Welder Reis, pessoas que convivi ao longo desses anos, que me concederam muitos momentos valiosos, me fazendo sentir mais confortável em continuar. Agradeço pelos momentos de descontração, conversas reflexivas e flexíveis, pelos lanches e pela ótima companhia.

A Valéria Coutinho Dias, que hoje eu posso dizer que se tornou uma pessoa importante pra mim. Agradeço por sempre manter-se ao meu lado, me fazendo alegre e confiante. Agradeço por não ter desistido e ter continuado e completado junto comigo esta etapa. Obrigada, “Panda”.

Agradeço à Jaqueline Medeiros T. por ser a pessoa que sempre me manteve com a cabeça no futuro, me proporcionando momentos que foram importantes para meu físico e mental, fazendo com que eu me sentisse mais estável em manter tudo na direção correta. Agradeço pelos momentos de risos, de imaginações e de criação de possíveis sonhos. Agradeço por ser a pessoa incrível que é.

Agradeço a mim. Obrigada por não ter desistido e sido paciente durante toda esta caminhada.

Cássia Adria Medeiros da Silva

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e conquistas, por me fortalecer nos momentos cruciais desta jornada.

A minha mãe, Selma Coutinho Dias, pelo amor, carinho e compreensão.

Aos meus amigos, Anderson Ferreira e Welder Reis, por todos os momentos de risos, descontração e motivação.

A minha amiga e parceira de TCC, Cássia Adria Medeiros da Silva, por estar comigo em todos os momentos da graduação, por ter se tornado uma inspiração para mim e também por ter confiado em mim.

Ao meu orientador, Dr. Victor Hugo Gomes Sales, pela oportunidade de ter acreditado no meu potencial.

À minha querida coorientadora Dra. Ana Caroline de Oliveira, por sua paciência e disponibilidade em ajudar durante todo este processo. Obrigada por sua dedicação.

Agradeço a mim, por não ter desistido, por ter trabalhado arduamente apesar dos obstáculos.

Obrigada!

Valéria Coutinho Dias

“Sonhe. Mesmo que seu início seja humilde, o fim será próspero.”

– ”So Far Away” de Agust D (SUGA do BTS)

## RESUMO

Os produtos lácteos probióticos e prebióticos estão em crescente demanda no mercado de alimentos funcionais. O frutooligossacarídeos (FOS) é um ingrediente prebiótico que promove o crescimento de culturas probióticas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com FOS sobre cinética de fermentação de leite de búfala. Assim, este trabalho visa agregar valor ao leite bubalino proveniente do estado do Amapá - Brasil, que é uma matéria-prima ainda pouco explorada, mas, de grande potencial socioeconômico para a região. O processo fermentativo das culturas de bactérias ácido lácticas, CY340 (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) e TA40 (*Streptococcus thermophilus*), com e sem adição de FOS, foi monitorado quanto aos parâmetros cinéticos pH e acidez. As associações em cultura mista CY340 sem adição de FOS provocaram a redução do tempo necessário para a diminuição do pH do leite fermentado. O valor de pH da co-cultura sem suplementação foi de 4,35 e 3,97 para os tempos de 6h e 8h, respectivamente. Quanto à co-cultura CY340 com adição de FOS, os valores de pH foram de 4,66 e 4,55 para as mesmas 6h e 8h, respectivamente.

Palavras-chave: Probióticos. Frutooligossacarídeos. Leite de Búfala. Cinética de Fermentação.

## ABSTRACT

Probiotic and prebiotic dairy products are in increasing demand in the functional food market. Fructooligosaccharide (FOS) is a prebiotic ingredient that promotes the growth of probiotic cultures. The objective of this study was to evaluate the effect of FOS supplementation on buffalo milk fermentation kinetics. Thus, this work aims to add value to buffalo milk from the state of Amapá - Brazil, which is a raw material still little explored, but of great socioeconomic potential for the region. The fermentative process of lactic acid bacteria cultures, CY340 (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) and TA40 (*Streptococcus thermophilus*), with and without the addition of FOS, was monitored for pH and acidity kinetic parameters. The associations in mixed culture CY340 without addition of FOS reduced the time required to decrease the pH of the fermented milk. The pH value of the co-culture without supplementation was 4.35 and 3.97 for the 6h and 8h, respectively. The co-culture CY340 with addition of FOS, the pH values were 4.66 and 4.55 for the same 6h and 8h, respectively.

Keywords: Probiotics. Fructooligosaccharide. Buffalo Milk. Fermentation Kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Prebiótico utilizado como suplementação da fermentação.	30
Figura 2 – Fluxograma das etapas da cinética de fermentação.	31
Figura 3 – Frascos Schott 's com 25 mL de leite em pó desnatado reconstituído.	32
Figura 4 – Distribuição do leite nas garrafas.	33
Figura 5 – Incubação das garrafas na BOD.	33
Figura 6 – Análise de pH da cultura TA 40 sem FOS após o tempo de 2h de fermentação.	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias comumente empregadas em produtos probióticos.	23
Tabela 2 – Organismos starter para produtos lácteos.	24
Tabela 3 – Oligossacarídeos de grau alimentar produzidos comercialmente.	26
Tabela 4 – Resultados encontrados de pH e acidez do leite bubalino <i>in natura</i> .	35
Tabela 5 - Dados tabelados da cinética de fermentação das culturas CY340 / <i>Streptococcus thermophilus</i> sem e com FOS e TA40/ da cultura <i>Streptococcus Thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> sem e com FOS.	36

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus thermophilus* sem FOS sob condição de temperatura de 42°C. 37
- Gráfico 2 – Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus thermophilus* com FOS 1% sob condição de temperatura de 42°C. 38
- Gráfico 3 – Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* sem FOS sob condição de temperatura de 42°C. 39
- Gráfico 4 – Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* com FOS 1% sob condição de temperatura de 42°C. 40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of official Agricultural Chemists</i>
BALs	Bactérias Ácido-Láticas
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CY340	Cultura <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FOS	Frutooligossacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial Hidrogeniônico
TA40	Cultura <i>Streptococcus thermophilus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Leites fermentados</b>	<b>18</b>
3.1.1	Iogurte	19
3.1.2	Leite fermentado ou cultivado	20
3.1.3	Kefir	20
3.1.4	Kumys	20
3.1.5	Coalhada	21
<b>3.2</b>	<b>Microrganismos probióticos</b>	<b>21</b>
3.2.1	Principais bactérias probióticas	22
<b>3.3</b>	<b>Uso de prebióticos e efeitos funcionais</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>Leite de búfala</b>	<b>27</b>
<b>3.5</b>	<b>Cinética de fermentação</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Culturas lácteas e suplemento na utilizado fermentação</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Cinética de fermentação</b>	<b>30</b>
4.2.1	Preparo dos materiais	31
4.2.2	Preparo do pé de cuba	31
4.2.3	Acompanhamento da cinética de fermentação	32
<b>4.3</b>	<b>Realização das análises de pH e acidez</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização do leite de búfala</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>Cinética</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Vários fatores têm contribuído para o desenvolvimento cada vez maior de alimentos funcionais. O principal deles é o aumento da consciência dos consumidores por hábitos saudáveis e melhor qualidade de vida (MORAES; COLLA, 2006). A nutrição otimizada é um desses novos conceitos, dirigida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Nesse contexto, os alimentos funcionais como os probióticos e prebióticos são conceitos recentes e estimulantes (ROBERFROID, 2002; SAAD, 2006).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode influenciar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais. Portanto, os alimentos funcionais são relevantes tanto para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

No Brasil, a uma resolução nº 398, de 30 de Abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define, para fins de registro, que “o Alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além das funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, precisas também produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”. Entre os ingredientes aprovados pela ANVISA para justificar uma alegação de propriedade funcional no rótulo estão ômega-3, fitoesteróis, fibras, luteína, zeaxantina, licopeno e probióticos (MANARINI; PEREIRA, 2016).

De acordo com recomendações da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e do *World Health Organization* (WHO), qualquer microrganismo vivo que cause efeitos fisiológicos benéficos sobre a saúde humana pode ser considerado probiótico. Desde que, o local de ação no organismo hospedeiro e seus benefícios sejam comprovados clinicamente. Dessa forma, o conceito de probiótico torna-se muito ampliado, sendo nele incluídos os microrganismos que não se desenvolvem no intestino ou não possuem efeito probiótico direto no hospedeiro, como *Streptococcus thermophilus* (Orla-Jensen, 1919) e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Orla-Jensen, 1919) Weiss et al. 1984, as bactérias envolvidas no processo de fabricação de iogurte. Os *Lactobacillus* geralmente citados como probióticos são: *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen, 1916) Hansen e Lessel 1971, *Lactobacillus acidophilus* (Moro, 1900) Hansen e Mocquot, 1970, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen, 1919) Bergey et al. 1934, *Lactobacillus cellobiosus* (Rogosa et al., 1953),

*Lactobacillus lactis* (Orla-Jensen, 1919) Bergey et al. 1934, *Lactobacillus fermentum* (Beijerinck, 1901), *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen, 1919) Bergey et al. 1923, e *Lactobacillus reuteri* (Kandler et al., 1982) (OLIVEIRA et al., 2009; KALANTZOPOULOS, 1997).

Prebióticos são nutrientes não digeríveis que promovem efeito benéfico para o hospedeiro por estimular seletivamente uma ou um grupo de bactérias do cólon com propriedade de probiótico(s). São prebióticos: frutooligossacarídeos, inulina, glico-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, xylo-oligossacarídeos, entre outros. O lactitol, a lactulose e a lactose não absorvida no intestino delgado podem ter efeito prebiótico no cólon (MORAIS; JACOB, 2006).

O frutooligossacarídeo (FOS), um derivado da inulina, com grau de polimerização de 2-10 unidades, não é metabolizado pelas enzimas digestivas e nem pela maioria das bactérias indesejáveis do intestino. Quimicamente, consiste em moléculas de sacarose, nas quais uma duas ou três unidades de frutose são adicionadas por ligações  $\beta$ -(2-1) à molécula de frutose da sacarose. O FOS e a inulina ocorrem naturalmente em muitas frutas e vegetais incluindo banana, cevada, alho poró, cebola, centeio, tomate, espargos, tubérculos, trigo, alcachofra e chicória, fazendo parte de uma dieta normal. O FOS pode ser extraído desses alimentos e concentrado ou pode ser fabricado industrialmente por processos enzimáticos. Nesse caso, ele pode ser produzido a partir de um açúcar simples, como a sacarose, por uma reação de transglicosilação ou por hidrólise controlada de polissacarídeos como a inulina (OLIVEIRA et al., 2009).

A bubalinocultura tem aumentado de forma significativa à participação no cenário agropecuário brasileiro, principalmente para produção leiteira. O Amapá possui um rebanho de aproximadamente mais de 300 mil cabeças de gado. Desse total, mais 270 mil é bubalino, o que coloca o estado na posição de segundo maior rebanho do país (EMBRAPA, 2018). Na parte costeira do Amapá predominam os rebanhos bubalinos, os quais avançam para o interior do continente, contornando o rio Araguari desde sua foz até o município de Ferreira Gomes. O município de Cutias possui o maior rebanho efetivo de bubalinos, com 25,33%, seguido de Macapá 24,4% e Tartarugalzinho com 14,31%. Estes três municípios concentram 64,54% do rebanho bubalino no estado (FUNI et al., 2010).

De acordo com Macedo et al. (2001), o leite de búfala apresenta características que o diferenciam de qualquer outro tipo de leite. Seus valores de lipídeos, proteínas, lactose, sólidos totais e resíduo mineral fixo são de grande importância nutricional. A ausência de  $\beta$ -caroteno na composição química do leite de búfala é uma de suas principais características,

conferindo-lhe coloração branca. Seu alto teor de cálcio faz com que seja recomendado a pessoas acometidas com osteoporose. É vital no processo de recuperação de pacientes em luta contra doenças de todos os tipos, que precisam ingerir alimentos de qualidade em pequenas doses ao longo do dia (DUBEY et al., 1997).

O leite pode ser utilizado como matéria-prima para outros produtos como o iogurte, cujo processo inclui a etapa de fermentação bacteriana, transformando seu açúcar em ácido láctico (SILVA, 2018). Entende-se por iogurte, o produto incluído na definição anterior, cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, aos quais podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas (BALs) que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007; CARNEIRO et al., 2012).

No mundo, em 2011, o leite de búfala representou 12,8% de todo o leite produzido mundialmente. A Índia, que possui uma população de 113 milhões de búfalos e 211 milhões de bovinos, em 2011 produziu 95 bilhões de litros de leite, tornando-se o maior produtor mundial de leite, sendo que 2/3 da produção foi de leite de búfalas (BERNARDES, 2013).

O aumento da demanda de derivados de leite de búfala nas últimas décadas valorizou a espécie bubalina na pecuária leiteira mundial. Os produtores brasileiros notaram o potencial de mercado e passaram a investir na bubalinocultura (SENO; CARDOSO; TONHATI, 2007).

É importante ressaltar que ainda falta uma legislação específica para determinar o padrão de identidade e qualidade do leite bubalino, porém é um produto bastante promissor para o desenvolvimento de novos produtos (AMARAL et al., 2005).

A elevação da importância do leite de búfala do ponto de vista industrial é evidenciada pela procura de produtos lácteos com alta variação e valor nutricional, além de uma excelente oportunidade para o Estado do Amapá, detentor do segundo maior rebanho de bubalinos, possa atrair reconhecimento e benefícios socioeconômicos. Neste contexto, o presente estudo tem por finalidade aprofundar o conhecimento na matéria-prima, que é o leite de búfala, a ser usada como potencial de inovação a partir de seus derivados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a cinética de fermentação de culturas lácticas em leite de búfala e avaliar o efeito da suplementação com frutooligosacarídeos (FOS) sobre parâmetros físico-químicos do leite.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre os probióticos e prebióticos, o uso dos mesmos no processo de elaboração de leites fermentados e possíveis efeitos benéficos à saúde;
- Caracterizar a matéria-prima (leite de búfala) quanto aos parâmetros de pH e acidez titulável;
- Avaliar o efeito da suplementação com FOS sobre a cinética de fermentação na cultura *Streptococcus thermophilus* (TA40) e da cultura mista de *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (CY340) em leite de búfala.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Leites fermentados

Os produtos lácteos são conhecidos há milênios, e é bastante provável que sejam usados para consumo humano desde os tempos das antigas tribos nômades, devido à grande disponibilidade de leite dos rebanhos que eram deslocados junto com as populações humanas (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2021).

A origem dos leites fermentados remete à antiguidade, provavelmente ao momento em que o homem começou a utilizar o leite dos animais na sua alimentação. As tribos nômades adquiriram o hábito de conservar o leite em odres<sup>1</sup> e recipientes de cerâmica ou peles de animais, onde o leite acabava fermentando, deste modo, envolvia a coagulação do leite por microrganismos presentes no meio, obtendo-se um produto final com características diferenciadas, observavam também um produto cuja vida útil era mais prolongada que a da matéria-prima (FARIA; BENEDET; GUERROUE, 2006). Desse modo, desenvolveu-se uma tecnologia empírica e foram surgindo os diferentes tipos de leites fermentados que, desde então, têm sido amplamente consumidos e comercializados em todo o mundo (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Falando de produtos fermentados, têm-se a necessidade de se referir a ao processo de fermentação de matérias-primas por ação de microrganismos. Os autores Prescott e Dunn (1957) e Doelle (1975) citados por Jay (2005) discutiram a história do conceito de fermentação e concluíram que o sentido geral no qual esse termo é normalmente utilizado é definido como “um processo no quais transformações químicas são realizadas em um substrato orgânico pela ação de enzimas produzidas por microrganismos”.

A indústria de lácteos tem utilizado bactérias ácido-láticas (BALs) nos mais variados produtos, como culturas iniciadoras ou adjuntas em leites fermentados e queijos, pois elas desempenham um papel de favorecer características sensoriais e tecnológicas, além de promover a conservação inibindo à competição da microbiota deteriorante e de agentes patogênicos (ORDOÑEZ et al., 2005; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa nº 46 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, entende-se por Leites Fermentados “os produtos adicionados ou não de

---

<sup>1</sup> **Odre** (ô) (do latim utre), também chamado de pele (do latim pelle), é como se chama um antigo recipiente feito de pele de animal, geralmente de cabra, usado para o transporte de líquidos como água, azeite, leite, vinho, manteiga ou mesmo queijo.

outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade” (BRASIL, 2007).

Considera-se que os leites fermentados apresentem propriedades terapêuticas por incluírem em sua composição bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que apresentam características probióticas, e essas apresentam efeitos bioquímicos sobre os nutrientes do leite e efeitos fisiológicos sobre o consumidor (FARIA; BENEDET; GUERROUE, 2006; GALLINA et al., 2012; LEUCAS, 2012). Dentre os produtos definidos como Leite fermentado, temos: iogurte, leite cultivado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada (CARNEIRO et al., 2012).

### 3.1.1 Iogurte

Entende-se por iogurte, o produto incluído na definição anterior, cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar outras BALs que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007, CARNEIRO et al., 2012).

Na fermentação do iogurte, inicialmente o *Streptococcus thermophilus* metaboliza a lactose produzindo ácido láctico, que diminui o pH favorecendo o crescimento dos lactobacilos. Há uma maior produção de acetaldeído (o componente volátil mais importante no sabor do iogurte) quando o *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* cresce em associação com o *Streptococcus thermophilus* (SIEUWERTS et al., 2010; OLIVEIRA, 2009). Sendo assim, uma bactéria favorece o desenvolvimento da outra.

O consumo regular de alimentos fermentados como o iogurte é reconhecidamente benéfico para a manutenção da boa saúde. Esse efeito é atribuído, em parte, às BALs utilizadas na elaboração do produto (ALVES et al., 2009). As ações dos microrganismos envolvidos no processo fermentativo do leite mostraram sua atuação benéfica no iogurte (MAZOCHI et al., 2010). Isto por se tratar de um alimento altamente rico em proteínas, cálcio e fósforo, com baixo teor de gorduras e fonte apropriada de minerais como zinco e magnésio. É especialmente recomendado para gestantes, lactantes, pessoas idosas ou que necessitem de reposição de cálcio e por apresentar uma elevada concentração de vitaminas (B6 e B12) comparada ao leite *in natura* (OLIVEIRA, 1993; ROCHA et al., 2008).

Além de ser considerado um alimento de alto valor nutritivo, como citado anteriormente, é associado à possibilidade de fabricação com diferentes teores de gordura, com adição de frutas, mel e cereais, que é sem dúvida, um fator que favorece a expansão do mercado deste produto (CARNEIRO et al., 2012).

### 3.1.2 Leite Fermentado ou Cultivado

O leite fermentado ou cultivado é o leite incluído na definição de Leites Fermentados (3.1), cuja fermentação se realiza com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Bifidobacterium spp.*, (Orla-Jensen 1924), *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla-Jensen 1919) Farrow and Collins 1984, e/ou outras BALs que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

Nesta mesma definição enquadra-se o leite acidófilo ou acidificado, cuja fermentação se realiza exclusivamente com cultivos de *Lactobacillus acidophilus* (BRASIL, 2007). Os lactobacilos usados na fabricação do leite acidófilo contribuem com o sabor e aroma em alimentos fermentados, produzindo vários compostos voláteis, como o diacetil e seus derivados (SILVA; STAMFORD, 2000).

### 3.1.3 Kefir

Dentro da Legislação Brasileira kefir é definido como um produto cuja fermentação se realiza com cultivo ácido láctico elaborado com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir* (Kandler e Kunath 1983), espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus* (Beij., 1889) Uden e H.R. Buckley 1970) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen, 1883) e *Saccharomyces exiguus* (Reess, 1870), *Lb. casei*, *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (BRASIL, 2007).

### 3.1.4 Kumys

Kumys é o produto que também está incluído na primeira definição de Leites Fermentados (item 3.1), cuja fermentação se realiza com cultivos de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Kluyveromyces marxianus* (BRASIL, 2007). A diferença entre kumys e kefir está baseada no fato que o leite utilizado é o de égua, os microrganismos não formam

grãos e ocorre uma maior produção de álcool (JAY, 2005).

Durante séculos, o kumys tem sido considerado uma bebida saudável, acinzentada, leve, efervescente, líquida (não coagula) e com acentuado sabor ácido e alcoólico (ORDÓÑEZ et al., 2005).

### 3.1.5 Coalhada

Coalhada é o produto também incluído na definição 3.1, cuja fermentação se realiza por cultivos individuais ou mistos de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico (BRASIL, 2007). Souza et al. (2011) citam que a coalhada é a parte sólida resultante da coagulação do leite. É considerado um alimento de alto valor nutritivo pelo elevado valor biológico das proteínas existentes e que proporcionam o aumento da biodisponibilidade de vitaminas do complexo B no trato intestinal promovendo uma melhor absorção de cálcio pelo organismo. Ainda, por também ser um produto que apresenta bactérias ácido lácticas em sua composição, atua no equilíbrio das funções intestinais (REIS, 2013).

## 3.2 Microrganismos probióticos

A partir do conhecimento de que microrganismos são favoráveis à saúde humana, em 1960, Richard Parker utilizou pela primeira vez o termo probiótico, com o significado de “a favor da vida”, de acordo com a origem grega do termo (BARBOSA et al., 2011). A definição de probióticos utilizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) é a seguinte: “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Os probióticos, associados ou não a bactérias, são apontados como agentes “biotecnológicos”. Além de exercerem efeitos benéficos no hospedeiro como citado anteriormente, atuam favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados (ANTUNES, 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

O uso de probióticos na dieta humana vem sendo amplamente difundido tanto como suplemento alimentar (leite, leites acidófilos, iogurtes, coalhadas, etc), como na forma de medicamento, como é o caso da levedura *Saccharomyces boulardii* (Seguela, Bastide e Massot, 1984), do *Lactobacillus rhamnosus* (Hansen 1968) e o *Lb. casei shirota* (BARBOSA, et al., 2011).

Consideram-se alguns leites fermentados como alimentos funcionais, por favorecerem a saúde do consumidor devido à presença de bactérias lácticas de culturas

probióticas, cuja origem geralmente é o trato gastrointestinal humano e que apresentam, além dos efeitos bioquímicos e biológicos sobre os nutrientes do leite, efeitos fisiológicos e terapêuticos para o consumidor (FARIA; BENEDET; GUERROUE, 2006; ANTUNES et al., 2007; MAZOCHI et al., 2010).

Os microrganismos utilizados como probióticos apresentam relação espécie-específica com o hospedeiro; devem ser identificados genotípica e fenotipicamente. E para este probiótico garantir efetividade, várias condições devem ser atendidas: não apresentar variação genética; ser estável; apresentar resistência ao ambiente ácido do estômago e a sais biliares; ter capacidade de proliferação, afinidade e sobrevivência no intestino; produzir metabólitos; fazer a modulação da atividade metabólica; a imunomodulação, além de ser seguro ao consumo e precisam ter seus efeitos sobre a saúde investigados (FAO/WHO, 2002; GIBSON; FULLER, 2000).

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (FULLER, 1989).

### 3.2.1 Principais Bactérias Probióticas

Entre os probióticos mais estudados, tanto para o desenvolvimento de novos produtos quanto à sua bioatividade, estão às bactérias e as leveduras. Alguns são comercializados e vendidos sob a forma de suplemento alimentar ou preparações farmacêuticas, contendo um ou vários microrganismos. Entre os principais probióticos estão as BALs. Além das BALs, temos também as bifidobactérias. (BARBOSA, et al., 2011).

Na tabela 1 a seguir estão descritas as principais bactérias utilizadas para elaboração de produtos com função probiótica.

Tabela 1- Bactérias comumente empregadas em produtos probióticos

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Outras
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranum</i>
<i>Lb. fermentum</i>		<i>Propionibacterium freundenreichii</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Pediococcus acidilacti</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		

Fonte: Collins; Thornton; Sullivan (1998).

As BALs são em sua maioria anaeróbias facultativas, podem crescer em presença de oxigênio, mas se desenvolvem melhor em meio com baixa tensão de oxigênio. São basicamente sacarolíticas e mesofílicas. Durante a fermentação, produzem grandes quantidades de ácido láctico. A grande quantidade de açúcar utilizado na produção de energia resulta em um acúmulo de ácido láctico, como produto principal e uma pequena quantidade de outros subprodutos. Dividem-se em homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas (realizam fermentação homolática) produzem, quase que exclusivamente ácido láctico quando desdobram a glicose, enquanto as heterofermentativas (realizam fermentação heterolática) produzem além de ácido láctico, outros compostos como dióxido de carbono, ácido acético, em quantidades apreciáveis. Para seu crescimento, precisam ser supridas de grande quantidade de nutrientes (FERREIRA, 2001; SILVA, 2007).

Heller (2001) apresenta uma visão geral das bactérias iniciadoras usadas em fermentações de laticínios e algumas de suas propriedades fisiológicas relevantes. Sendo estas fornecidas a seguir na Tabela 2.

Tabela 2- Organismos starter para produtos lácteos

Espécie	Fermentação de ácido láctico			
	<sup>1</sup> HomoF	<sup>2</sup> HeteroF	<sup>3</sup> Á.L. (%)	<sup>4</sup> pH F
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	+		1,5 - 1,8	3,8
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	+		1,5 - 1,8	3,8
<i>Lb. helveticus</i>	+		1,5 - 2,2	3,8
<i>Lb. acidophilus</i>	+		0,3 - 1,9	4,2
<i>Lb. kefir</i>		+	1,2 - 1,5	-
<i>Lb. brevis</i>		+	1,2 - 1,5	-
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	+		1,2 - 1,5	-
<i>S. thermophilus</i>	+		0,6 - 0,8	4,5
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+		0,5 - 0,7	4,6
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	+		0,5 - 0,7	4,6
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	+		0,5 - 0,7	4,6
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>		+	0,1 - 0,2	5,6
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>		+	0,1 - 0,2	5,6
<i>Bifidobacterium</i> ( <i>bifidum</i> , <i>infantis</i> , etc)			0,1 - 14	4,5

<sup>1</sup>Homofermentativas; <sup>2</sup>Heterofermentativas; <sup>3</sup>Ácido láctico; <sup>4</sup>pH Final

Fonte: Adaptado de Heller (2001).

O desempenho tecnológico das culturas é de fundamental importância na fabricação de produtos alimentícios. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas ao produto e serem viáveis durante o armazenamento (OLIVEIRA et al., 2002).

As duas culturas probióticas usadas experimentalmente neste trabalho serão descritas abaixo.

a) *Streptococcus thermophilus*

*S. thermophilus* é uma bactéria ácido láctica, anaeróbica facultativa, gram-positiva e termofílica, do grupo homofermentativa, ou seja, produz o ácido láctico como principal produto da fermentação (SACCARO, 2008). Tem a função bioajustadora em processos fermentativos na presença de bactérias probióticas que têm crescimento lento em leite. Apresenta morfologia de cocos, geralmente dispostos em cadeia curta. Cresce em temperaturas entre 37 e 45°C, tolerando temperaturas acima de 50°C (FERREIRA, 2003).

b) *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

O gênero *Lactobacillus* é representativo dos bastonetes gram-positivo, produtores de ácido láctico, e são importantes para a indústria. São bactérias aerotolerantes e produzem ácido láctico a partir de carboidratos simples (TORTORA; FUNKE; CHRISTINE, 2005).

O grande uso das bactérias do gênero *Lactobacillus* em alimentos decorre dos resultados de seu comportamento nos mesmos, como capacidade de fermentar açúcares, formando ácido láctico abundantemente; capacidade térmica, tornando-a resistente a tratamentos térmicos mais baixos; alta elaboração de ácido láctico, eliminando de seus substratos microrganismos competitivos; capacidade de formar substância voláteis, alterando valores sensoriais de determinados alimentos; e incapacidade de sintetizar a maioria das vitaminas exigidas, impedindo seu crescimento em meios carentes desses nutrientes reguladores (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2021).

### 3.3 Uso de prebióticos e efeitos funcionais

Há um grande aumento no consumo dos alimentos funcionais, que além de apresentarem características nutricionais e tecnológicas peculiares, atendem as exigências do consumidor que busca alimentos inovadores (ARAÚJO, 2007). A indústria de laticínios vem se destacando nesse aspecto com o maior número de produtos funcionais, através da adição de probióticos e prebióticos em alimentos como o iogurte e os leites fermentados no geral. Dentre esses alimentos, destacam-se os frutooligossacarídeos (ANTUNES et al., 2007; SANTOS; BARBOSA; BARBOSA, 2011; ROSA; CRUZ, 2017).

De acordo com Oliveira et al. (2009) prebióticos foram inicialmente definidos como ingrediente alimentício não digerível que afeta de maneira benéfica o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento e/ou da atividade de uma bactéria ou de um número limitado delas- no cólon, fornecendo então saúde para o hospedeiro.

Na Tabela 3 relaciona os oligossacarídeos produzidos comercialmente, ordenados de acordo com o grau de utilização no mercado mundial. A oligofrutose representa uma das maiores classes de oligossacarídeos bifidogênicos em termos de produção mundial.

Tabela 3 - Oligossacarídeos de grau alimentar produzidos comercialmente.

1. Lactulose	7. Glucosilsacarose*
2. Galactooligossacarídeo	8. Ciclodextrinas*
3. Frutooligossacarídeo (FOS)	9. Oligossacarídeos de soja
4. Isomalto-oligossacarídeo	10. Lactosacarose
5. Malto-oligossacarídeo*	11. Gentioligossacarídeo
6. Palatinose-oligossacarídeo	12. Xylo-oligossacarídeo

\*Não são bifidogênicos.

Fonte: Ferreira (2002)

Segundo Santos, Barbosa e Barbosa (2011), os prebióticos são considerados fibras que não são digeridas nem absorvidas pelo intestino delgado, pois são resistentes à ação das enzimas salivares e intestinais. Seus nomes derivam de oligossacarídeos compostos predominantemente de frutose. O termo oligofrutose é mais frequentemente empregado na literatura para descrever inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise parcial da inulina de chicória. O termo Frutooligossacarídeos (FOS) tende a descrever misturas de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (DAVIDSON; CARVALHO, 2007).

Os FOS apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos; não podem ser considerados carboidratos ou açúcares, nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos (ROSA e CRUZ, 2017). São considerados prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Acidophillus* e *Bifidus*. Essa característica faz com que os frutooligossacarídeos promovam uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer (PASSOS; PARK, 2003).

Os Frutooligossacarídeos são ingredientes alimentares ideais para a indústria de alimentos, por terem aplicação em várias áreas, sendo indicado o seu uso em formulações dietéticas como sorvetes, cremes vegetais, patês e sobremesas, adicionados em barras de cereais e biscoitos para elevar o conteúdo de fibras alimentares, e também em bebidas lácteas e leites fermentados (BORNET, 1994).

O FOS quimicamente consiste em moléculas de sacarose, nas quais uma duas ou três unidades de frutose são adicionadas por ligações  $\beta$ -(2-1) à molécula de frutose da sacarose. O

FOS e a inulina ocorrem naturalmente em muitas frutas e vegetais traz incluindo banana, cevada, alho poró, cebola, centeio, tomate, espargos, tubérculos, trigo, alcachofra e chicória trazem, fazendo parte de uma dieta normal. Podendo ser extraído desses alimentos e concentrado ou pode ser fabricado industrialmente por processos enzimáticos. Nesse caso, ele pode ser produzido a partir de açúcar simples, como a sacarose, por uma reação de transglicosilação ou por hidrólise controlada de polissacarídeos como a inulina (OLIVEIRA et al., 2009).

Estes compostos apresentam importância nutricional e tecnológica, podendo ser utilizados em alimentos, tanto como suplemento, quanto como substitutos de macronutrientes. Como suplementos, são adicionados devido às suas propriedades nutricionais, aumentando o teor de fibra dos produtos. Em outras aplicações, são adicionados para permitirem alegações de propriedade funcional, como aquelas relacionadas à atividade bifidogênica (propicia o crescimento das bifidobactérias) (COSTA et al., 2013).

A ingestão diária de frutooligossacarídeos como alimento ou como ingrediente de alimentos é comprovadamente benéfica à saúde humana, devido principalmente ao efeito prebiótico que promovem no organismo (PASSOS; PARK, 2003).

### **3.4 Leite de búfala**

De acordo com a Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002) “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem-alimentadas e descansadas”. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. Alimento muito rico em nutrientes, o leite aparece em nossas refeições diárias de várias maneiras, quer seja na forma *in natura* (fluido) ou em diversos produtos derivados lácteos (SILVA; SILVA; FERREIRA, 2012).

Diversos trabalhos no Brasil constataram que o teor médio de gordura no leite bubalino se situa entre 5,8 e 8,2 %, o de proteínas entre 3,6 e 4,8%; e de lactose entre 4,8 e 5,5%, resultando num conteúdo de sólidos totais entre 15,4 e 17,4% (BERNADES, 2013). Outra característica é possuir um sabor bem adocicado, apesar de não possuir mais lactose que o leite bovino. Seu alto teor de cálcio faz com que seja recomendado contra a osteoporose. É vital no processo de recuperação de pacientes em luta contra doenças de todos os tipos, que precisam ingerir alimentos de qualidade em pequenas doses ao longo do dia (DUBEY et al., 1997).

Neste contexto, o leite de búfala é cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados (queijos, iogurte, doce de leite, etc.) quando comparado ao leite bovino. Esta característica é derivada do elevado teor de extrato seco total, além de características físicas como densidade e disposição coloidal dos constituintes do leite (ANDRADE et al., 2011).

Entre os muitos produtos que podem ser elaborados a partir do leite, o iogurte ocupa colocação de destaque, pois, além de diminuir os problemas de perdas dessa matéria-prima, por causa de sua perecibilidade e sua composição, que o deixa suscetível à deterioração microbiana, mostra grande valor nutricional e elevada aceitação. Além de ser considerada uma grande fonte de vitaminas e minerais, que auxiliam na preservação da saúde (SILVA, 2018).

É importante ressaltar que ainda falta uma legislação específica para determinar o padrão de identidade e qualidade do leite bubalino, porém é um produto bastante promissor para o desenvolvimento de novos produtos (AMARAL et al., 2005).

A produção de leite bovino registrou no mundo um aumento de 48% em 1980 e 2011, a produção de leite bubalinos foi de 23,8% (BERNARDES, 2013).

No Brasil, a criação de búfalos vem crescendo cerca de 12,7% ao ano, ocupando de forma bastante satisfatória os ambientes pouco favoráveis aos bovinos. Com a finalidade principal da criação de búfalos em algumas regiões é a produção leiteira. De acordo com pesquisas realizadas, o leite de búfala apresenta elevado valor nutricional devido aos altos níveis nutrientes, podendo ser consumido tanto na forma *in natura* como na elaboração de produtos lácteos (VERUMA; SALGADO, 1994).

Estima-se, com base no censo agropecuário de 2006 e na evolução do rebanho e da captação (137%), que a produção de leite de búfalas no Brasil em 2011 tenha sido de cerca de 156 milhões de litros, produzidos por cerca de 130.000 búfalas em 3.000 rebanhos e que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país, que transformam anualmente 75 milhões de litros de leite em 22 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de R\$ 156 milhões aos laticínios e de cerca de R\$ 41 milhões aos criadores (BERNARDES, 2013).

Das variações de búfalos existentes no Brasil, duas predominam no Amapá, sendo "mediterrâneo e murrá", os mais populares por terem aptidão para carne e leite. O estado possui um rebanho com mais de 300 mil cabeças de gado, sendo mais de 270 mil bubalino, o que coloca o estado na posição de segundo maior rebanho do país (EMBRAPA, 2018). Predominante na parte costeira do Amapá, os rebanhos de bubalinos, avançam para o interior do continente, contornando o rio Araguari desde sua foz até o município de Ferreira Gomes.

O município de Cutias possui o maior efetivo de bubalino, com 25,33%, seguido de Macapá 24,4% e Tartarugalzinho com 14,31%. Estes três municípios concentram 64,54% do rebanho bubalino no estado (FANI et al., 2010).

A produção e o consumo da bubalinocultura leiteira vêm demonstrando crescente importância comercial no estado do Amapá, com o surgimento de estudos com base na produção de produtos lácteos e incluindo funcionais. A partir do exposto acima, podemos citar os trabalhos de Machado e Cavalcante (2019) e Araújo e Foro (2019).

### **3.5 Cinética de fermentação**

Em uma fermentação ocorrem muitas transformações, células crescem se reproduzem e morrem, substâncias diversas existentes no meio são consumidas pelos microrganismos e produtos de metabolismo são lançados no meio em que os microrganismos atuam (COPERSUCAR, 1987).

De acordo com Schmidell et al. (2001) o estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entendem-se como componentes, microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura. Além desse aspecto, cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação entre as diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.).

Deste modo, o acompanhamento do processo fermentativo é de extrema importância para que se possa compreender melhor a cinética e posteriormente poder determinar o rendimento, eficiência e produtividade de cada processo a ser estudado (MILLER, 1959).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Culturas lácticas e suplemento utilizado na fermentação

As culturas de bactérias ácido lácticas, *Streptococcus thermophilus* (TA40) e *Streptococcus thermophilus e Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CY340) utilizadas foram as das empresas Danisco e DMS Food Specialties, respectivamente. Ambas as culturas foram analisadas durante um tempo de fermentação, para avaliar a suplementação com FOS no processo de cinética de fermentação do leite búfala. O prebiótico FOS usado como suplementação na fermentação do leite de búfala foi o da marca K`psula prebiótica Ekobé (Figura 1).

O prebiótico utilizado é um suplemento para o sistema gastro intestinal, contendo em sua formulação além de FOS liofilizado, vitamina C, cloridrato de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), vitamina E, bisglicinato de magnésio, bisglicinato de zinco, antiumectante dióxido de silício, lubrificante estearato de magnésio e excipiente celulose microcristalina.

Figura 1 - Prebiótico utilizado como suplementação da fermentação.



Fonte: Arquivo pessoal – Silva e Dias (2021)

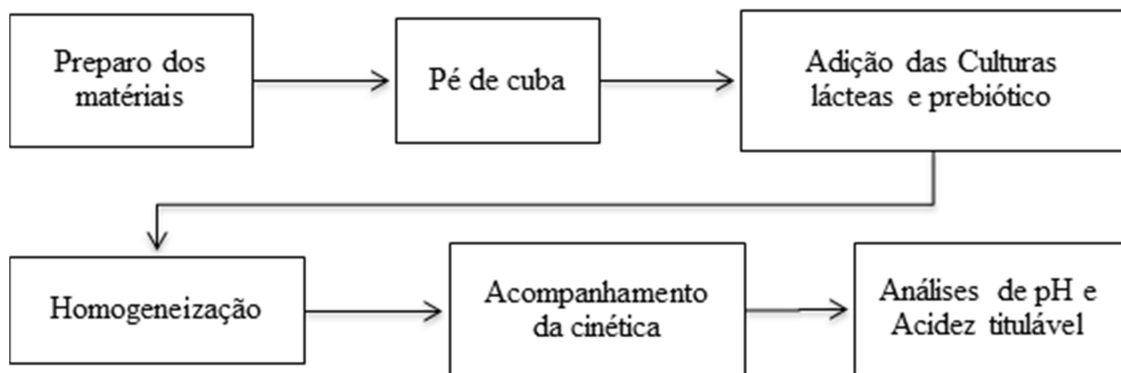
### 4.2 Cinética de fermentação

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá, *Campus* Macapá. Utilizou-se leite bubalino procedente do município de Cutias do Araguari, Amapá.

O experimento foi realizado no período de janeiro de 2021 com a execução de avaliação do desenvolvimento cinético das culturas lácticas com e sem o uso de suplementação, durante determinado período de tempo, até a diminuição do pH e consequente aumento da acidez.

O fluxograma apresentado na figura 2 mostra cada etapa do procedimento de cinética de fermentação empregado neste estudo.

Figura 2- Fluxograma das etapas da cinética de fermentação.



Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021)

#### 4.2.1 Preparo dos materiais

Para realizar a cinética de fermentação foram separados os seguintes materiais: Becker, Provetas, Erlenmeyers, Frascos Schott de 50 ml, vidro relógio, espátulas e garrafas plásticas.

#### 4.2.2 Preparo do pé de cuba

O preparo do pé de cuba foi realizado de acordo com os estudos de Araújo e Foro (2019) que avaliaram a cinética e modelagem matemática do crescimento de culturas ácido lácticas em leite de búfala sob condições isotérmicas para elaboração de iogurte.

As culturas liofilizadas foram ativadas em leite em pó desnatado reconstituído em água destilada 10% (m/v). O leite depois de reconstituído foi distribuído (25 mL) em quatro frascos Schott de 50 ml (Figura 3). Os frascos foram esterilizados em autoclave durante 5 minutos em temperatura de 110°C e resfriados em temperatura ambiente.

Após o preparo e resfriamento do leite, foram inoculadas 0,1 g de cada cultura em 25 mL de leite desnatado reconstituído. Os frascos schott 's foram então homogeneizados até a completa diluição e em seguida, incubados por 24 horas em BOD a 42°C.

Figura 3 - Frascos Schott 's com 25 mL com leite em pó desnatado reconstituído.



Fonte: Arquivo pessoal – Silva e Dias (2021).

#### 4.2.3 Acompanhamento da cinética de fermentação

Após 24h de incubação, o conteúdo de cada frasco foi transferido para béqueres de 500mL, homogeneizados com 250mL de leite de búfala, devidamente pasteurizado a 95°C por 5 min. Posteriormente, foi acrescentado 1% prebiótico FOS liofilizado em dois dos béqueres com as diferentes culturas utilizadas no experimento. Após homogeneização, 35mL foram distribuídos em garrafas plásticas (Figura 4), que foram sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm e enxaguadas com água destilada.

Deste modo, a distribuição nas garrafas se sucedeu da seguinte maneira: garrafas com 250mL de leite de búfala + cultura CY340 com e sem FOS e garrafas com 250mL de leite de búfala + cultura TA40 com e sem FOS. Sendo analisadas quatro cinéticas diferenciadas.

As garrafas foram incubadas a 42°C na BOD estando identificadas quanto ao tipo de cultura, adição de FOS e ao tempo estimado para retirada para realizar as análises de pH e acidez a cada 2h de fermentação, assim como mostra a figura 5. A fermentação foi acompanhada até a o tempo de 8h de fermentação, levando em consideração a aproximação ao pH 4,5.

Figura 4 - Distribuição do leite nas garrafas



Fonte: Arquivo pessoal – Silva e Dias (2021)

Figura 5 - Incubação das garrafas na BOD



Fonte: Arquivo pessoal – Silva e Dias (2021)

Figura 6 - Análise de pH da cultura TA 40 sem FOS após o tempo de 2h de fermentação.



Fonte: Arquivo pessoal – Silva e Dias (2021)

### 4.3 Realização das análises de pH e acidez titulável

As análises de pH e acidez foram realizadas em triplicata no leite *in natura* e no decorrer da cinética de fermentação. Os resultados são expressos em termos de médias e desvios padrões.

As análises foram realizadas de acordo com o descrito no Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2017).

O percentual de ácido láctico do leite *in natura* e durante a cinética foi determinado utilizando-se de uma bureta digital, com solução alcalina (hidróxido de sódio 0,1N) e fenolftaleína 1% como indicador (AOAC, 2016). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de ácido láctico.

A avaliação do potencial hidrogeniônico foi realizada com pH-metro de bancada (Figura 6). Antes das leituras, o pH-metro foi calibrado utilizando de dois padrões abrangendo a faixa de pH a ser medida. As soluções padrões usadas foram as de pH 7,0 e 4,0 (BRASIL, 2017).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do leite de búfala

Na tabela 4 estão os dados obtidos com o leite *in natura* de búfala. Devido à ausência de uma legislação específica para o leite de búfala em relação à identidade e qualidade, os dados obtidos das análises foram comparados com os parâmetros estabelecidos pelo Sistema de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo na Resolução SAA n° 03, de 10 de Janeiro de 2008 e com outros trabalhos que analisaram os mesmos parâmetros em leite de búfala.

Tabela 4 - Resultados encontrados de pH e acidez do leite bubalino *in natura*.

Parâmetros	pH	Acidez (%)
Resultados obtidos	6,67 ± 0,023	0,225 ± 0,004
*Parâmetro (SAA)	6,40 - 6,90	0,14 - 0,23
Araújo e Foro (2019)	6,59 ± 0,044	0,2715 ± 0,0267
Pignata et al., (2014)	6,72 ± 0,06	0,15 ± 1,41

\*Parâmetros da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (média ± desvio padrão).

Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021)

O valor médio de pH obtido para o leite de búfala *in natura* foi igual a 6,67. Tal valor encontra-se inferior ao valor obtido por Pignata et al. (2014) de 6,72. Por outro lado, encontra-se superior aos valores obtidos por Araújo e Foro (2019) no seu estudo com leite de búfala do município do Curiaú do estado do Amapá, que foi de 6,59. Contudo, encontra-se dentro da faixa estabelecida pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do estado de São Paulo (6,40 - 6,90) para produção de leite e derivados do leite de búfala.

A acidez encontrada no leite foi de 0,225% ácido láctico, valor este, inferior ao comparado ao trabalho de Araújo e Foro (2019), que foi de 0,2715% ácido láctico. Na resolução da SAA o nível de acidez apresentado em ácido láctico é de 0,14 - 0,23, porém, neste trabalho o nível de acidez se apresenta superior. Do mesmo modo, apresenta-se superior ao valor encontrado por Pignata et al. (2014) de 0,15 de porcentagem de ácido láctico.

Segundo Figueiredo; Junior; Toro (2010), estas variações na acidez titulável podem estar relacionadas ao fornecimento de alimentos e minerais inapropriados, silagens de baixa qualidade, e multiplicação de microrganismos deterioradores e/ou patogênicos. Tanto as físicas, como as demais análises que são aplicadas ao leite de búfala pode haver diferenças na

composição, pois o leite de búfala apresenta características físico-químicas próprias, que variam conforme o período de lactação, a raça e a alimentação, entre outros fatores (TEIXEIRA; BASTINETTO; OLIVEIRA, 2005).

## 5.2 Cinética

Durante o processo de fermentação, foi acompanhado a variação de pH e acidez em função do tempo, por até 8h. Os dados estão tabelados (Tabela 5) e em gráficos para melhor visualização do resultado obtido na cinética.

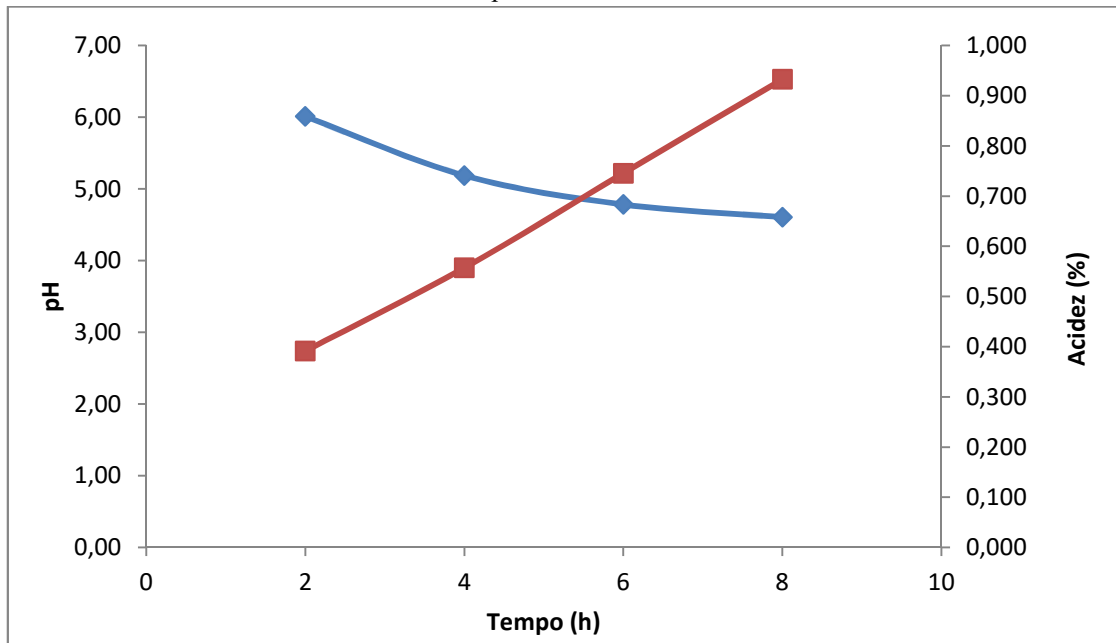
Tabela 5 - Dados tabelados da cinética de fermentação das culturas CY340 / *Streptococcus thermophilus* sem e com FOS e TA40/ da cultura *Streptococcus Thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* sem e com FOS.

<sup>1</sup> Cultura CY340 sem FOS			Cultura CY340 com FOS	
Tempo (h)	Acidez (%)	pH	Acidez (%)	pH
2	0,416 ± 0,012	6,23 ± 0,006	0,342 ± 0,001	6,33 ± 0,012
4	0,659 ± 0,034	5,08 ± 0,010	0,724 ± 0,018	5,37 ± 0,021
6	1,002 ± 0,010	4,35 ± 0,026	1,155 ± 0,020	4,81 ± 0,035
8	1,576 ± 0,025	3,97 ± 0,015	1,371 ± 0,020	4,45 ± 0,015
<sup>2</sup> Cultura TA40 sem FOS			Cultura TA40 com FOS	
Tempo (h)	Acidez (%)	pH	Acidez (%)	pH
2	0,391 ± 0,011	6,01 ± 0,026	0,308 ± 0,010	6,66 ± 0,074
4	0,557 ± 0,007	5,19 ± 0,012	0,689 ± 0,008	5,35 ± 0,010
6	0,746 ± 0,015	4,78 ± 0,006	0,867 ± 0,011	4,82 ± 0,006
8	0,933 ± 0,020	4,61 ± 0,029	0,941 ± 0,011	4,66 ± 0,006

<sup>1</sup>Cultura *Streptococcus Thermophilus* + *Lactobacillus Delbrueckii ssp. Bulgaricus*; <sup>2</sup>Cultura *Streptococcus thermophilus*

Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021).

Gráfico 1 - Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus thermophilus* sem FOS sob condição de temperatura de 42°C.



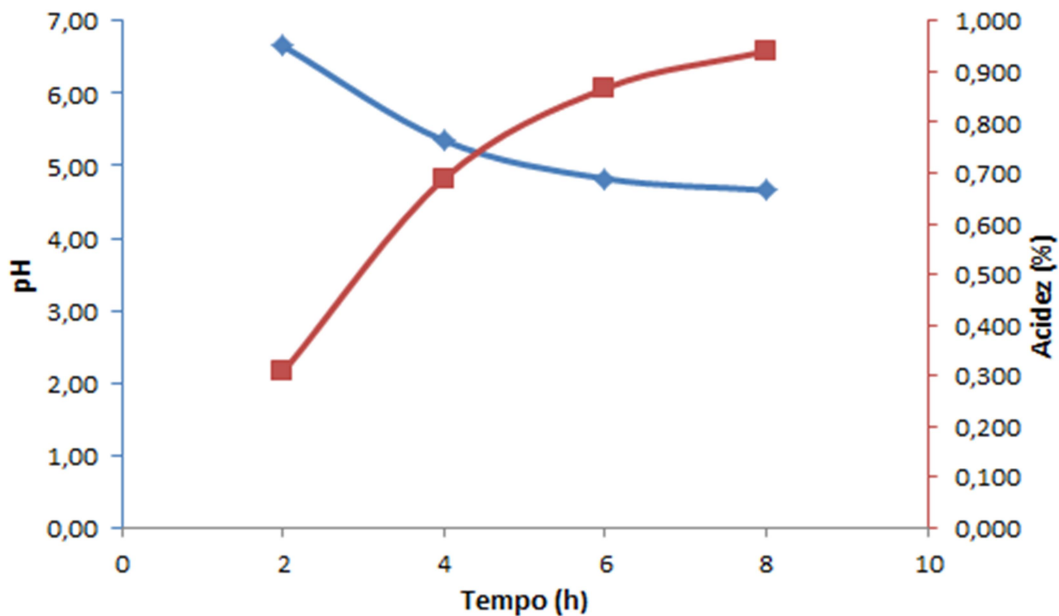
Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021)

No Gráfico 1 da cultura TA40 sem suplementação observou-se que o pH durante o intervalo de 2 a 8 horas variou entre 6,01 à 4,61, respectivamente, sendo possível observar o aumento da acidez titulável de 0,391 à 0,933% neste mesmo intervalo de tempo. Segundo Walstra et al. (1999), as bactérias lácticas produzem diferentes quantidades de ácido láctico durante a fermentação por 24 horas em temperatura ótima.

A conversão de lactose em ácido láctico é resultante da multiplicação das culturas no leite. Essa ocorre geralmente em velocidade muito lenta, não garantindo o pH adequado em um tempo considerado relativamente curto para a obtenção de certos derivados. Esse fato é observado particularmente para a obtenção de leites fermentados e queijos, produtos que necessitam de leite com pH adequado para que ocorra a coagulação. Durante a elaboração de leites fermentados, o efeito do pH sobre a coagulação é direto ao atingir pH 4,3-4,5 (KOMATSU; SAAD; BURITI, 2008).

Araújo e Foro (2019), que estudaram o crescimento fermentativo desta mesma cultura TA40 em leite de búfala, obtiveram no tempo de 6 h de fermentação o valor de pH 4,71, próximo ao encontrado neste trabalho de 4,78.

Gráfico 2 - Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus thermophilus* com FOS 1% sob condição de temperatura de 42°C.



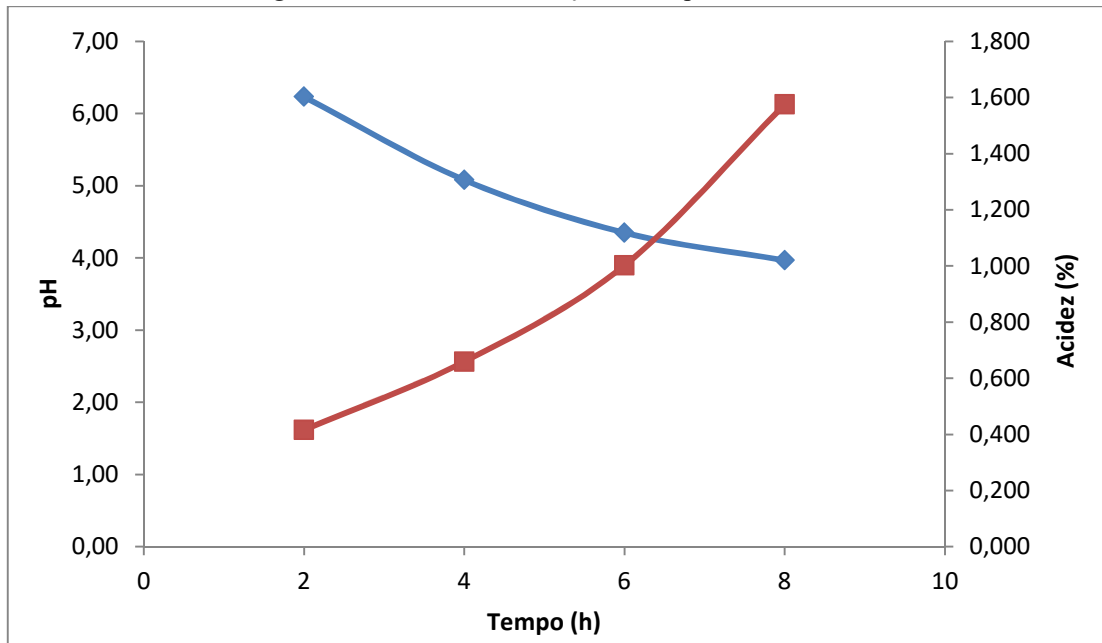
Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021)

Foi observado na cinética da cultura TA40 com FOS (Gráfico 2), quando comparado com o gráfico 1 da mesma cultura, TA40 sem suplementação, que o abaixamento do pH durante o intervalo de tempo (2-8h) foi mais lento, alcançando no tempo final de 8h o valor de 4,66. Paralelamente, o aumento da acidez para a cultura TA40 com suplementação com FOS se estabelece em maior porcentagem, indo em média de 0,308 a 0,941%, sendo que no tempo 6h já apresentava 0,867% de acidez. No intervalo de tempo de 2 à 4h já havia um aumento da acidez maior em comparação no mesmo intervalo de tempo na cultura TA40 sem FOS.

Oliveira (2009) em seu estudo sobre o efeito da inulina prebiótica na produção de leite fermentado probiótico averiguou que o tempo de fermentação diminuiu com adição de inulina durante a fermentação com diferentes culturas probióticas. Isso pode estar relacionado a hidrólise da molécula de FOS realizada por esta bactéria. Assim como citado por Barrangou et al. (2003), descreve que algumas espécies de microrganismos devem apresentar a capacidade de hidrolisar, por meio de enzimas, as ligações  $\beta(2-1)$  do FOS, resultando na formação de monômeros de carboidratos, que posteriormente podem ser usados para serem metabolizados, o que acaba gerando mais ácido lático como produto da fermentação. No entanto, para a cultura TA40 neste estudo, não houve diferença numérica notável em relação ao tempo de fermentação com o uso de FOS em relação ao não suplementado.

A inulina, oligofrutose e os FOS são quimicamente similares, diferindo apenas pelo grau de polimerização, ou seja, pelo número de unidades de monossacarídeos que compõem a molécula (DAVIDSON; CARVALHO, 2007).

Gráfico 3 - Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus Thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* sem FOS sob condição de temperatura de 42°C.



Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021)

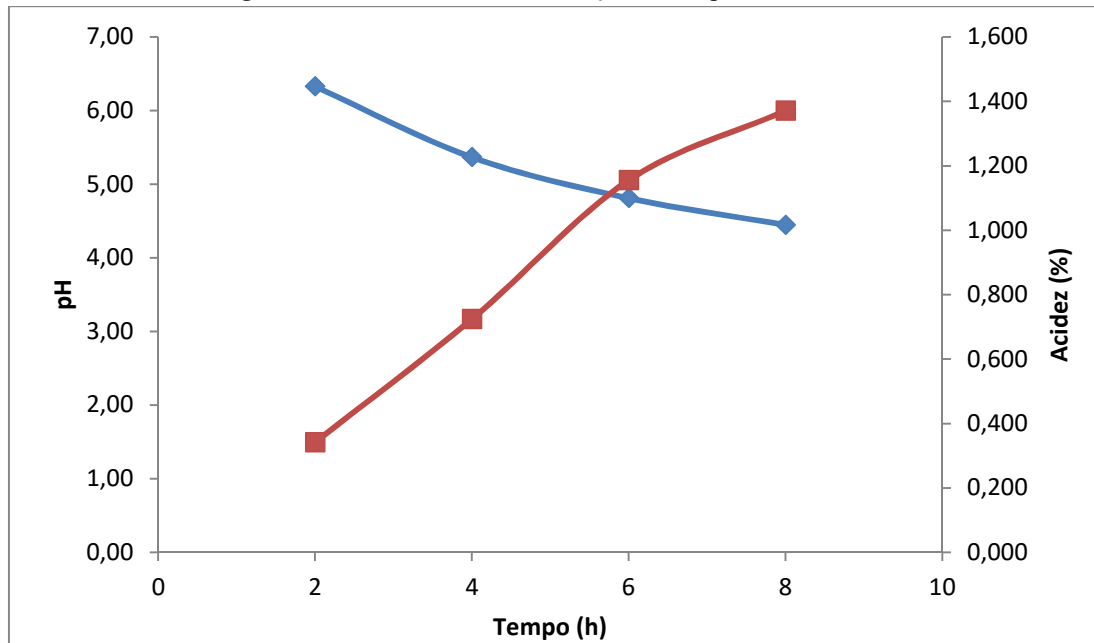
Na fermentação no leite de búfala com a cultura CY340 sem FOS (Gráfico 3) o pH diminuiu mais rapidamente. No tempo 6h já havia estabelecido o valor de 4,35 e com valor final no tempo de 8h de 3,97. Em comparação com a cultura TA40 sem FOS (Gráfico 1), apresenta-se mais eficiente, pois houve diminuição do tempo de fermentação.

A função geral da cultura láctica deve ser capaz de produzir ácido láctico suficiente em um período de tempo tão curto quanto possível para fermentar o leite (DAMIN, 2003). Em relação à acidez, inicialmente, no tempo 2h de fermentação o valor médio foi de 0,416% de ácido láctico e na medida em que o pH diminui, a acidez aumenta, acidez obtida ao final foi de 1,576% de ácido láctico no tempo de 8h. No trabalho de Araújo e Foro (2019), os valores obtidos foram inferiores durante o intervalo de tempo de 2 à 10h, variando de 0,42 a 0,67% de ácido láctico.

O *S. thermophilus* cresce primeiro e tem a capacidade de clivar a lactose a pH mais neutro. Com o seu crescimento, o ácido láctico é acumulado no meio, abaixando parcialmente o pH e lançando ao meio algumas substâncias aminadas originadas da proteína do soro, que vão estimular o desenvolvimento do *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Este, por sua vez, passa a

crescer, abaixa ainda mais o pH e lança no meio aminoácidos que estimulam o crescimento do *S. thermophilus* (FERREIRA, 2001). Através desta simbiose tende-se com o passar do tempo, ter um aumento no acúmulo de ácido lático no meio.

Gráfico 4 - Cinética de fermentação da cultura *Streptococcus Thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* com FOS 1% sob condição de temperatura de 42°C.



Fonte: Elaboração própria – Silva e Dias (2021)

No gráfico (Gráfico 4) é apresentado a cinética de fermentação da cultura CY340 com suplementação de FOS a 1%, no qual iniciou-se o pH com 6,33 no tempo de 2h, até 4,45 no tempo de 8h. A acidez durante o início e o fim da fermentação apresentou, respectivamente, 0,342 e 1,371% de ácido lático. Em relação à mesma cultura com a suplementação com FOS (Gráfico 3), os valores foram menos efetivos, pois apresentou a diminuição do pH e aumento da acidez retardados pelo uso do prebiótico. Diferentemente do apresentado nos estudos de Farinha (2016) que estudou o uso de prebiótico proporcionou bons resultados em termos de parâmetros cinéticos, com co-culturas. Por outro lado, o trabalho de Oliveira (2009) obteve resultados que mostraram que a qualidade do leite fermentado foi fortemente influenciada tanto pela composição de diferentes co-culturas probióticas, quanto por diferentes prebióticos, como oligofrutose, polidextrose, maltodextrina e inulina.

Este antagonismo pode ser fundamentado quando há excesso de fonte de carbono no meio, ocorrendo à repressão catabólica que atua como um dispositivo auto-regulatório para limitar o consumo de carboidratos, respeitando a capacidade metabólica do microrganismo. (BRUCKNER; TIGEMEYER, 2002; TEBERGA, 2017). Mesmo que as bactérias lácticas

precisam ser supridas de quantidade considerável de nutrientes para seu crescimento, devendo ter disponíveis no meio substâncias, como: hidratos de carbono, aminoácidos, peptonas, lipídios, vitaminas e sais minerais como descrito por Tamime; Robinson (1999) e Ferreira (2003), a concentrações elevadas destes, podem vir a desfavorecer o processo de fermentação, prejudicando o metabolismo do microrganismo.

## **6 CONCLUSÃO**

O uso de suplementação com frutooligossacarídeo na cinética de fermentação do leite de búfala em associação com bactérias probióticas, neste estudo, demonstrou ter efeito em relação ao tempo de fermentação, no qual o mesmo foi efetivamente mais lento, levando em consideração a diminuição de pH. Contudo, o mesmo quando correlacionado a aplicação em produtos lácteos como leites fermentados para o aumento do valor nutricional e funcional, demonstra grande potencial a ser explorado.

## REFERÊNCIAS

- ADITIVOS & INGREDIENTES. **Fermentação e Produtos Lácteos Fermentados**. Disponível em: <<https://aditivosingredientes.com.br/artigos/laticinios/fermentacao-e-produtos-lacteos-fermentados>> Acesso em: 06 de Fev. de 2021.
- ALVES, L. L. et al. Aceitação sensorial e caracterização de frozen yogurt de leite de cabra com adição de cultura probiótica e prebiótico. **Revista Ciência Rural**, v. 39, p. 2595-2600, 2009.
- AMARAL, F. R. et al. Qualidade do Leite de Búfalas: Composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.106-110, 2005.
- ANDRADE, D. et al. Efeito da Estação do Ano na Qualidade do Leite de Búfalas. **Revista Verde de Agroecologia e desenvolvimento sustentável (GVAA)**. v.6, nº3, p.33-37, Mossoró/RN, 2011.
- ANTUNES L.A.F. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. **Revista Indústria de Laticínios**, 2001 ;6(34):30-4. 15.
- ANTUNES, A. E. C. et al. Desenvolvimento de butter milk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007.
- ANVISA. Portaria nº 398, de 30 de Abril de 1999, Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://anvisa.busms.xn--sade-rra.gpv.br/bus/sa%C3%BAde>> Acesso em: 09 de Fev de 2021.
- ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 e de inulina**. 2007. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- ARAÚJO, K. S.; FORO, N. G. T. **Cinética e Modelagem Matemática do Crescimento de Culturas ácido Lácticas em Leite de búfala sob condições isotérmicas para elaboração de Iogurte**. (Trabalho conclusão de Curso), 2019.
- Association of Official Analytical Chemist. **Official Methods of Analysis**. Washington (DC): AOAC; 2016.
- BARBOSA, F. H. F., et al. Probióticos – microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, vol.11, núm. 1, 2011, p. 11-21.
- BERNARDES, O. Produção de Búfalas Leiteiras. Simpósio Nacional de Bovinocultura. Anais 2nd. **IV International Symposium of Dairy Cattle**, Vancouver, 2013.
- BORNET, F. R. J. Indigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 7635- 7695, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a granel. Brasília, DF, 2002.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007.** Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, DF, 2007.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal.** Secretaria de Defesa da Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2017.

CARNEIRO, C.S. et al. Leites fermentados: histórico, composição, características físico químicas, tecnologia de processamento e defeitos. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 27, Ed. 214, Art. 1424, 2012.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. In. **International Dairy Journal.**, Oxford, v.8, p.487-490, 1998.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO (COPERSUCAR). Centro de Tecnologia. Divisão Industrial. **Fermentação.** São Paulo, 1987. 434 p.

COSTA, M. P. et al. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2013.

DAMIN, M. R. **Efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína e proteína concentrada de soro na obtenção de leites fermentados contendo probióticos.** (Dissertação de Mestrado) São Paulo, 2003. 116p.

DAVIDSON, P.; CARVALHO, G. Ecologia e disbiose intestinal. In: PASCHOAL V.; NAVES, A.; FONSECA, A. B. B. L. **Nutrição Clínica Funcional: dos princípios à prática clínica.** São Paulo: Valéria Paschoal, 2007.

DOELLE, H. A. **Bacterial Metabolism.** New York: Academic Press. 1975.

DUBEY, P. et al. Factors affecting composition of milk of buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.67, p.802 – 804, 1997. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Factors-affecting-composition-of-milk-of-buffaloes-Dubey-Suman/e875d253c2c17f45a875eb87b6cee3963e37bd06> > Acesso em: 11 de Fev. de 2021.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Pesquisador da Embrapa apresentou benefícios do Programa de Melhoramento Genético de Búfalos para Criador e Gestores do Amapá.** Pesquisador: MARQUES, J. R. Entrevistadora: FREITAS, D. - Secom do Governo do Amapá. Palestra na 1º expobufalo do Amapá, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/34812318/pesquisador-da-embrapa-apresentou-beneficios-do-programa-de-melhoramento-genetico-de-bufalos-para-criadores-e-gestores-do-amapa>> Acesso em: 11 de Fev. de 2021.

FAO/WHO. **Food and Agricultural Organization/World Health Organization Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** London, Ontario. - Canada, 2002. 11 p. Disponível em: <[https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) > Acesso em: 09 de Fev. de 2021.

FARIA, C.P.; BENEDET, H.D.; GUERROUE, J.L. Parâmetros de produção de leite de búfala

fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, 2006.

FARINHA, L. R. L. **Efeito da composição de bactérias lácticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina**. 121 f. Tese (Doutorado) – São Paulo, 2016.

FERREIRA, A. C. Breve História e Perspectivas para a Indústria de Laticínios no Brasil. In: **Anais do 2º Simpósio de Tecnologia de Produtos Lácteos Germinal**, p. 23- 30, 2002.

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

FERREIRA, C.L.L. Produtos lácteos fermentados (aspectos bioquímicos e tecnológicos). **Caderno Didáticos**, 2 ed. Editora UFV, 2001.

FIGUEIREDO, E.L., JUNIOR, J.B.L., TORO, M.J.U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “*in natura*” produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.04, n.01, p.19-28, 2010.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal applied bacteriology**. Oxford, v.66,p.365-378, 1989.

FUNI, C. et al., Caracterização dos Rebanhos do Estado do Amapá. Dados da Agulha Oficial. **Secretaria de Estado do Meio Ambiente. GEA – Governo do Estado do Amapá**, 2010. Disponível em: < [www.sema.ap.gov.br](http://www.sema.ap.gov.br)> Acesso em: 06 de Fev. de 2021.

GALLINA, D. A. et al. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação de viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012.

GAVA, J. A.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia dos alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Livraria Nobel, 2008. 511 p.

GIBSON G. R.; FULLER R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**. 2000; 130(2S Suppl): 391S-5S.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, p. 374-379, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6º ed.711p. Editora: Artmed, Porto Alegre- 2005.

KALANTZOPOULOS, G. **Fermented products with probiotic qualities**. *Anaerobe*. Apr-Jun 1997; 3 (2-3):185-90. doi: 10.1006/anae.1997.0099. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996497900998>> Acesso em: 05 de Fev. 10 de Fev. de 2021.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 44, n.3, p.330-332, 2008.

- LEUCAS, H. L. B. **Efeitos benéficos de microrganismos envolvidos na produção de leite fermentado**. 2012. 51p. (Monografia), Belo Horizonte, 2012.
- MACEDO, M. P. et al. Composição Físico Química e Produção do Leite de Búfala da Raça Mediterrânea no Oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3. p.1084-1088, 2001.
- MACHADO, P. N.; CAVALCANTE, M. A. Elaboração de Bebida fermentada de leite Búfala Adicionada de calda de mangaba (*Hancornia speciosa*). **VI Jornada Científica do IFAP**, 2019.
- MANARINI, T.; PEREIRA, R. C. **Alimentos funcionais**. 172p. Editora: Abril S.A. São Paulo, 2016.
- MAZOCHI, V., et al. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com *Bifidobacterium* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, 2010.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 326-428. 1959.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol 3(2), 109-122, 2006.
- MORAIS, M. B; JACOB, A. M. C; J. **O papel dos Probióticos e Prebióticos na prática pediátrica**. Vol.82, nº5, Porto Alegre, 2006.
- OLIVEIRA, J. S. Produção e conservação de iogurte. **Revista Leite e Derivados**, v2., n. 10, p.34-38, 1993.
- OLIVEIRA, M. N. et al. **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais**. 1º edição. – 384 p. Editora: ATHENEU. São Paulo, 2009.
- OLIVEIRA, M.N., et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002.
- OLIVEIRA, R. P. de S. **Efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, São Paulo, 2009.
- ORDÓÑEZ, J.A. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280 p.
- PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Revisão Bibliográfica- Frutooligossacarídeo: implicação na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 3,nº 2, p.385-390, 2003.
- PIGNATA, M. C. et al. Estudo Comparativo da Composição Química, Ácidos Graxos e Colesterol de Leites de Búfala e Vaca. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 226 – 233, out. – dez., 2014.

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Industrial Microbiology**. New York: McGraw-Hill. 1957.

REIS, D. L. dos. **Qualidade e Inocuidade microbiológica dos derivados lácteos fermentados produzidos no Distrito Federal, Brasil** (Dissertação de Mestrado) – Brasília, 2013. 76 p.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, 2002. 34:S105-10. 8.

ROCHA, C. et al. **Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 255-266, 2008.

ROSA, L. P. S; CRUZ, D. J. Artigo de revisão. Aplicabilidade dos Frutooligossacarídeos como Alimento Funcional. **Nutrivisa- Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**. Vol. 4, nº1 - Goiás, 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: O Estado da Arte. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, Vol. 4, nº 1 - São Paulo, 2006.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação textura e viabilidade em leite fermentado**. São Paulo, 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). São Paulo, 2008.

SANTOS, R. B; BARBOSA, L. P. J. L; BARBOSA, F. H. F. **Probióticos: microrganismos funcionais**. Ciência Equatorial, Amapá, v. 1, n. 2, p. 26-38, 2011.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. Vol 2. Engenharia Bioquímica. – São Paulo: Blucher, 2001.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – SAA. **Resolução SAA nº 03. de 10 de Janeiro de 2008**. Trata das normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos destinados a leite e produtos lácteos. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 10 Jan. 2008.

SENO, L. O; CARDOSO, L. U; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de Produção de Leite de Búfala No Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.36 nº 6, suppl. Viçosa, 2007.

SIEUWERTS, S. et al. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Applied and Environmental Microbiology**., v.76, n.23, 7775-7784, 2010.

SILVA, A. S. S. P. **Desenvolvimento de Iogurte de Búfala com Abacaxi em Calda**. (Trabalho de conclusão de curso). Pernambuco, 2018.

SILVA, G.; SILVA, A. D.; FERREIRA, M. P. B. **Processamento de leite**. (Curso técnico em Alimentos) EDUFRPE, 167p, Recife: 2012.

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 68-69, p. 41-50, 2000.

SILVA, S.V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico.** (Dissertação / Mestrado), 2007.

SOUZA, G.C. et al. Desenvolvimento de coalhada seca em diferentes tempos de processamento. **Revista Tecnológica**, Edição especial, V Simpósio de Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, p.75-82, 2011.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. Yoghurt: Science and Technology. 2. ed. **Boca Raton: CRC**, 1999, 368p.

TEIXEIRA, L. V.; BASTINETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de Búfala na Indústria de Produtos Lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CHRISTINE, L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VERUMA, M. R; SALGADO, J. M. Análise Química do Leite de Búfala em comparação ao Leite de vaca. **A ciência Agrícola**, v.51, n.1, p.131 -137, 1994.

WALSTRA, P. et al. Dairy Technology: Principles of milk properties and processes. **New York: Marcel Dekker**, 1999. 727p.