



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

LARISSA DOS SANTOS FREITAS

Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos

Brasília – DF

2024

LARISSA DOS SANTOS FREITAS

Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Animais.

Área de Concentração:
Ciências Animais e Multidisciplinares

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antônio
Mendonça

Brasília – DF

2024

LARISSA DOS SANTOS FREITAS

Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Animais.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Antônio Mendonça

(Presidente da Banca – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda

(Membro Interno – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Sascha Habu

(Membro Externo – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Brasília – DF

2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus pelo dom da vida, por me fortalecer e capacitar diante das dificuldades. Em todos os momentos, nunca estive sozinha ou desamparada, pois o meu Deus me guiou e abençoou durante todo o processo.

Agradeço aos meus pais, Irenice e Ronaldo, por serem a minha fortaleza. Muito obrigada por todo o apoio e incentivo, vocês são o meu tesouro aqui na terra. Vocês são exemplos vivos de coragem, persistência e amor. Eu amo vocês.

Quero agradecer a minha irmã, Laura Inês, por cuidar de mim, me apoiar, me incentivar e vibrar comigo a cada conquista. Eu amo você mais que a mim mesma, você é a minha inspiração. Agradeço ao meu namorado, Lucas Martins, por estar ao meu lado e me apoiar em todos os momentos. Muito obrigada por me fortalecer quando me sinto fraca, você é o meu equilíbrio, meu norte e meu abrigo. Eu amo você, meu amor.

Agradeço a minha eterna orientadora, Eliana dos Santos “*in memoriam*”, sem a senhora nada disso seria possível. Com a senhora eu aprendi muito, um conhecimento que irei levar por toda a vida. A senhora é luz, é exemplo de força, garra e persistência. Sou eternamente grata a Deus por ter me dado a honra de poder conhecê-la e compartilhar momentos maravilhosos com a senhora. Muito obrigada prof, a senhora será sempre a nossa deusa da microbiologia e estará sempre presente em meu coração.

Meu muito obrigada ao meu orientador, Márcio Antônio, por me acolher de braços abertos, me incentivar e me auxiliar durante essa trajetória. Muito obrigada por confiar no meu trabalho e me apoiar, independentemente da situação, sem o senhor eu não teria conseguido. Agradeço à professora Sandra por me receber e me acolher em seu laboratório. A senhora é detentora de um conhecimento extraordinariamente vasto, muito obrigada por compartilhar parte dele comigo. Muito obrigada aos técnicos Thaís, Mário e Luiz, por, gentilmente, me auxiliarem nas análises.

Agradeço aos meus amigos Carol e Thalysson, vocês tornaram essa caminhada mais leve e feliz. Carolzinha, você foi enviada por Deus, muito obrigada por pegar na minha mão e me apoiar em todos os momentos, você foi um presente de Deus em minha vida.

Meu muito obrigada à CAPES pela bolsa de estudos e, principalmente, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais por toda a experiência vivida e conhecimentos adquiridos.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar. ”

Josué 1:9

RESUMO

Introdução: O leite possui em sua composição nutrientes essenciais para a saúde humana, como lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, por possuir muitos nutrientes, ele é considerado uma excelente matriz para as bactérias lácticas. As bactérias lácticas são responsáveis por realizar o processo de fermentação, esse processo também é de grande interesse para as indústrias alimentícias, pois por meio dele é possível aumentar o tempo de prateleira dos produtos e protegê-los contra patógenos. Os probióticos são benéficos à saúde humana, pois eles modificam a flora intestinal, fortalecem o sistema imunológico, exercem proteção contra microrganismos patogênicos e ainda melhoram valor nutricional aos produtos que foram inseridos. Para que uma bactéria láctica seja considerada probiótica é necessário que ela seja segura, apresente resistência a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), apresente atividade antimicrobiana e capacidade de aderir ao epitélio intestinal. As matrizes lácteas também são excelentes matrizes, pois aumentam a resistência e protegem os probióticos durante a passagem pelo TGI. Apesar de apresentar alta tolerância ao TGI, o *L. plantarum* não consegue se desenvolver adequadamente no leite, pois não utiliza de forma eficiente os substratos presentes no leite, como a caseína e lactose. Uma forma de aumentar a viabilidade do *L. plantarum* no leite é fornecer substratos necessários por meio de suplementações com fontes de aminoácidos. A farinha de grão-de-bico é fonte de proteína, aminoácidos essenciais, minerais e carboidratos. **Objetivo:** Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do leite fermentado com duas bactérias potencialmente probióticas, *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7, enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico. **Metodologia:** Para elaboração das formulações foi utilizado leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%, sacarose e farinha de grão-de-bico. Quatro formulações foram elaboradas: (i) (FC1) LDR a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL; (ii) (FT1) LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL + farinha de grão-de-bico (4,5%); (iii) (FC2) LDR a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log UFC /mL; (iv) (FT2) LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log UFC /mL + farinha de grão-de-bico (4,5%). As características físico-químicas (pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, estabilidade durante o armazenamento, capacidade de retenção de água, fenólicos totais e atividade antioxidante) e microbiológicas (viabilidade e simulação *in vitro*) foram avaliadas em todas as formulações. **Resultados:** A formulação teste com a adição de 4,5% de farinha de grão-de-bico (FT1) apresentou valores significativamente menores ($P<0,05$) de pH e valores significativamente maiores ($P<0,05$) de acidez titulável durante a fermentação de 24 horas em relação as formulações controle (FC1). O mesmo foi observado na formulação FT2 em relação ao controle (FC2). Não houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as formulações em relação ao teor de proteína, já em relação aos teores de carboidratos e cinzas, as formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram teores significativamente ($P<0,05$) maiores. Durante o armazenamento refrigerado, as formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram valores significativamente menores ($P<0,05$) de pH e SST e valores significativamente maiores de ($P<0,05$) de acidez titulável e viabilidade dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7, em relação as formulações controles FC1 e FC2 (independente da estirpe). Além disso, as formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram uma melhor estabilidade durante armazenamento (mL) no 28º dia de armazenamento, em relação as formulações controle FC1 e FC2 (independente da estirpe). Não houve diferença significativa ($P<0,05$) em relação a sobrevivência dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 sob condições simuladas *in vitro* do TGI nas diferentes formulações. As

formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram valores significativamente maiores ($P < 0.05$) de fenólicos totais, durante a fermentação (24 horas) e armazenamento (0 e 28 dias), em relação as formulações controle FC1 e FC2 (independente da estirpe). **Conclusão:** A adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico aumentou a viabilidade dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 durante o armazenamento de 28 dias, reduziu a sinérese durante armazenamento e aumentou o teor de fenólicos totais durante a fermentação (24 horas) e armazenamento (0 e 28 dias).

Palavras-chave: Leite; bactérias lácticas; farinha de grão-de-bico; viabilidade; potencial probiótico.

ABSTRACT

Introduction: Milk contains essential nutrients for human health, such as lipids, carbohydrates, proteins, vitamins and minerals. As it has many nutrients, it is considered an excellent matrix for lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria are responsible for carrying out the fermentation process, this process is also of great interest to the food industry, as it makes it possible to increase the shelf life of products and protect them against pathogens. Probiotics are beneficial to human health, as they modify the intestinal flora, strengthen the immune system, provide protection against pathogenic microorganisms and also improve the nutritional value of the products that were inserted. For a lactic acid bacteria to be considered a probiotic, it must be safe, resistant to passage through the gastrointestinal tract (GIT), have antimicrobial activity and the ability to adhere to the intestinal epithelium. Dairy matrices are also excellent matrices, as they increase resistance and protect probiotics during passage through the GIT. Despite having high tolerance to the GIT, *L. plantarum* cannot develop properly in milk, as it does not efficiently use the substrates present in milk, such as casein and lactose. One way to increase the viability of *L. plantarum* in milk is to provide necessary substrates through supplementation with amino acid sources. Chickpea flour is a source of protein, essential amino acids, minerals and carbohydrates. **Objective:** To evaluate the physicochemical and microbiological characteristics of milk fermented with two potentially probiotic bacteria, *L. plantarum* S180.7 or *L. plantarum* SBR64.7, enriched or not, with 4.5% chickpea flour. **Methodology:** 10% reconstituted skimmed milk (LDR), sucrose and chickpea flour were used to prepare the formulations. Four formulations were developed: (i) (FC1) 10% LDR (100%) + 10% sucrose + *L. plantarum* S180.7 8 log CFU/ mL ; (ii) (FT1) LDR 10% (95.5%) + 10% sucrose + *L. plantarum* S180.7 8 log CFU/ mL + chickpea flour (4.5%); (iii) (FC2) 10% LDR (100%) + 10% sucrose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log CFU/ mL ; (iv) (FT2) LDR 10% (95.5%) + 10% sucrose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log CFU/ mL + chickpea flour (4.5%). The physicochemical (pH, titratable acidity, total soluble solids, stability during storage, water retention capacity, total phenolics and antioxidant activity) and microbiological (viability and *in vitro simulation*) characteristics were evaluated in all formulations. **Results:** The test formulation with the addition of 4.5% chickpea flour (FT1) presented significantly lower values ($P < 0.05$) of pH and significantly higher values ($P < 0.05$) of acidity titratable during the 24-hour fermentation in relation to the control formulations (FC1). The same was observed in the FT2 formulation in relation to the control (FC2). There was no significant difference ($P < 0.05$) between the formulations in relation to protein content, in relation to carbohydrate and ash content, the FT1 and FT2 formulations (regardless of the strain), with the addition of 4.5% of chickpea flour presented significantly ($P < 0.05$) higher levels. During refrigerated storage, formulations FT1 and FT2 (regardless of strain), with the addition of 4.5% chickpea flour showed significantly lower values ($P < 0.05$) of pH and TSS and significantly higher values ($P < 0.05$) of titratable acidity and viability of the potential probiotics *L. plantarum* S180.7 and SBR64.7, in relation to the control formulations FC1 and FC2 (regardless of the strain). Furthermore, the FT1 and FT2 formulations (regardless of the strain), with the addition of 4.5% chickpea flour, showed better stability during storage (mL) on the 28th day of storage, compared to the control formulations. FC1 and FC2 (independent of strain). There was no significant difference ($P < 0.05$) in relation to the survival of the potential probiotics *L. plantarum* S180.7 and SBR64.7 under simulated *in vitro conditions* of the GIT in the different formulations. Formulations FT1 and FT2 (regardless of strain), with the addition of 4.5% chickpea flour, showed significantly higher values ($P < 0.05$) of total phenolics during fermentation (24 hours) and storage (0 and 28 days), in relation to the control formulations FC1 and FC2 (regardless of the strain). **Conclusion:** The addition of 4.5% chickpea flour increased the viability of the potential probiotics *L. plantarum* S180.7

and SBR64.7 during 28-day storage, reduced syneresis during storage and increased the content of total phenolics during fermentation (24 hours) and storage (0 and 28 days).

Keywords: Milk; lactic acid bacteria; chickpea flour; viability; probiotic potential.

LISTA DE FIGURAS

CAPTULO 1

Figura 1 Probióticos autorizados pela ANVISA para adolescentes e adultos..... 26

Figura 2 Probióticos autorizados pela ANVISA para lactentes (0 a 12 meses) ou crianças de primeira infância (1 a 3 anos). 27

Figura 3 Classificação taxonômica de *Lactobacillus plantarum* 30

Figura 4 Composição química da farinha de trigo e grão-de-bico (%). 36

CAPÍTULO 2

Figura 1 Sólidos solúveis totais (°Brix) das formulações FC1, FT1 (A), FC2 e FT2 (B), ao longo do tempo de fermentação. *Diferenças estatísticas ($P > 0,05$) comparando formulação controle contra formulação teste com adição de farinha. Letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott. 89

Figura 2 Viabilidade (Log UFC mL⁻¹) das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas), independente da adição ou não de farinha de grão-de-bico. Letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott-Knott..... 91

Figura 3 Teor de fenólicos totais das formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas). Valores médios de fenólicos totais das formulações ao longo do tempo de fermentação (A). Concentração de fenólicos totais das diferentes formulações (B). Na figura (A) letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), e na figura (B) letra minúscula representa diferença estatística entre formulações ($P > 0,05$) de acordo com o teste Scott- Knott. (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%)..... 93

Figura 4 Atividade antioxidante determinada pelo ensaio FRAP nas formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas). Comportamento das formulações FC1 e FT1 (A), FC2 e FT2 (B) ao longo do tempo de fermentação. Valores de atividade antioxidante das diferentes formulações (C). Na figura (A e B) letra minúscula

representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), e na figura (C) letra minúscula representa diferença estatística entre formulações ($P > 0,05$) de acordo com o teste Scott-Knott. (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%)..... 97

Figura 5 Atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH nas formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas). Comportamento das formulações FC1 e FT1 (A), FC2 e FT2 (B) ao longo do tempo de fermentação. *Diferenças estatísticas ($P > 0,05$) comparando formulação controle contra formulação teste com adição de farinha. Letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott. (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). 98

LISTA DE TABELAS

CAPTULO 2

Tabela 1 pH e acidez titulável (g/100 g de ácido láctico) das formulações a base de leite, adicionadas de farinha de grão-de-bico e fermentadas por as estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 durante período de 24 horas.. 86

Tabela 2 Equações de regressão que descrevem os dados de sólidos solúveis totais, viabilidade, fenólicos totais, FRAP e DPPH ao longo da cinética de crescimento das estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7..... 87

Tabela 3 Composição centesimal das formulações (%). 99

Tabela 4 pH, acidez titulável (g/100 g de ácido láctico), sólidos solúveis totais (°Brix) e viabilidade (Log UFC mL⁻¹) das formulações ao longo do armazenamento. 103

Tabela 5 Estabilidade física (mL) e capacidade de retenção de água (%) das formulações ao longo do armazenamento. 105

Tabela 6 Teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante FRAP e DPPH das formulações ao longo do armazenamento. 108

Tabela 7 Sobrevivência de *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal. 110

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT - Acidez titulável

BAL - Bactérias lácticas

DSRC - Capacidade relativa de eliminação do radical DPPH●

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP - Potencial antioxidante redutor do Fe

FAO – Food and Agriculture Organization

FRAP - Fluorescence Recovery After Photo bleaching

HCl – Ácido clorídrico

H₃BO₃ – Ácido bórico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

MRS - Man Rogosa and Sharpe

NaOH – Hidróxido de sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

UFC - Unidades formadoras de colônias

SST – Sólidos Solúveis Totais

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

GRAS - Generally Recognized as Safe

CO² - Dióxido de carbono

TGI – Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
CAPÍTULO 1	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Leite.....	19
3.2 Bactérias láticas.....	20
3.3 Bactérias láticas probióticas.....	24
3.4 <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
3.5 Leite fermentado probiótico.....	32
3.6 Farinha de grão-de-bico.....	35
3.7 Efeito protetor do leite fermentado a estirpes probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal.....	37
4 METODOLOGIA	40
4.1 Tipo de estudo.....	40
4.2 Preparo da cultura estoque.....	40
4.2.1 Ativação dos micro-organismos e padronização das culturas <i>L. plantarum</i> S180.7 e <i>L. plantarum</i> SBR 64.7	41
4.3 Elaboração das formulações a base de leite desnatado reconstituído enriquecido ou não com 4,5% de farinha de grão-de-bico	42
4.4 Determinação da cinética de crescimento dos micro-organismos <i>L. plantarum</i> S180.7 e <i>L. plantarum</i> SBR64.7 nas diferentes formulações.....	43
4.4.1 pH.....	43
4.4.2 Acidez titulável	43
4.4.3 Sólidos Solúveis Totais	44
4.4.4 Viabilidade.....	44
4.5 Determinação da composição química centesimal das formulações	44

4.5.1	Umidade.....	45
4.5.2	Proteína.....	45
4.5.3	Lipídio	46
4.5.4	Resíduo mineral (cinzas)	47
4.5.5	Fibra Bruta.....	47
4.5.6	Carboidrato	48
4.6	Caracterização físico-química e microbiológica das formulações durante armazenamento refrigerado a 4°C.....	48
4.6.1	Estabilidade física	48
4.6.2	Capacidade de retenção de água	49
4.6.3	Viabilidade.....	49
4.7	Sobrevivência de <i>L. plantarum</i> S180.7 e SBR 64.7 após exposição às condições simuladas <i>in vitro</i> do trato gastrointestinal	49
4.7.1	Determinação da porcentagem de sobrevivência das bactérias <i>L. plantarum</i> S180.7 e <i>L. plantarum</i> SBR64.7	51
4.8	Concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações	52
4.8.1	Preparo das amostras.....	52
4.8.2	Fenólicos Totais	53
4.8.3	Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP).....	53
4.8.4	Capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)	54
4.9	Análise estatística dos resultados	55
	REFERENCIAS	56
	CAPÍTULO 2	70
	Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i> L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos	70

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em:

Capítulo 1: composto pela Introdução, Revisão Bibliográfica, Objetivos e Materiais e Métodos;

Capítulo 2: composto pelos Resultados, Discussão e Conclusão da pesquisa, apresentados em formato de um artigo original, intitulado “Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos”, submetido a revista indexada a área de Microbiologia.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O leite é proveniente de uma ordenha completa e sem interrupções, com vacas sadias, devidamente alimentadas e descansadas (MAPA, 2002). O leite possui nutrientes essenciais, tais como lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais (FOROUTAN et al., 2019). Em sua composição química, o leite possui cerca de 3,5 % de proteína, 3,7 % de gordura e cerca de 4,9 % de lactose (OLATUNJI et al., 2012). A proteína predominante no leite (caseína), possui os nove aminoácidos essenciais ao organismo humano. (HUTH et al., 2006; JAVAID et al., 2009). Os minerais encontrados no leite (cálcio, fósforo, magnésio, zinco e selênio) possuem função de formação óssea e de transporte de oxigênio. Enquanto a lactose, o açúcar encontrado no leite e a fração lipídica são excelentes fontes de energia, as vitaminas agem como antioxidantes (ABERRA et al., 2013).

As bactérias lácticas (BALs) são formadas por um grupo gram-positivo, catalase e oxidase negativa. Geralmente estão presentes no solo, silagem, leite, vegetais e carnes. Estas, também são utilizadas por indústrias para proteger produtos alimentícios contra ação de microrganismos patogênicos (LUNARDI et al., 2021; COSTA et al., 2019). As BALs podem ser classificadas em homofermentativas (produz somente ácido lático) e heterofermentativas (além do ácido lático são capazes de sintetizar ácido acético ou etanol e CO₂) (SILVA, 2022). A partir do processo de fermentação, as BALs proporcionam aumento da vida de prateleira dos alimentos. Isso ocorre devido a hidrólise de carboidratos e concomitante aumento do ácido lático, que ocasiona a queda de pH, dificultando assim a proliferação de patógenos (PEREIRA, 2020; SILVA et al., 2020).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Para que uma bactéria láctica seja considerada probiótica, ela deve ser segura (ausência de virulência e genes transferíveis de resistência a antibióticos), ser resistente as situações adversas do trato gastrointestinal, e além disso possuir atividade antimicrobiana e capacidade de aderência ao epitélio intestinal (SHOKRYAZDAN et al., 2017; COSTA et al., 2019). Os probióticos são benéficos, pois modificam a flora intestinal, oferecem proteção contra patógenos, fortalecem o sistema imunológico e agregam valor nutricional aos alimentos (COSTA et al., 2013; TRIPATHI, 2014).

O *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria láctica (BAL) gram-positiva, heterofermentativa facultativa e com morfologia de bastonete. Possui diversas cepas, isoladas dos mais diversos nichos ecológicos, como por exemplo: vegetais, carne, frutas, leite, silagem e trato gastrointestinal de humanos e animais (TODOROV, 2010; SOUZA et al., 2013). Os compostos produzidos durante a fermentação realizada pelo *L. plantarum* contribuem para as características organolépticas dos alimentos, tais como, sabor, aroma e textura (SOUZA et al., 2013; LIU, 2018).

Além dessas características, o *L. plantarum* também possui resistência a condições adversas enfrentadas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (HAMEED et al., 2021). Para conseguir colonizar o cólon, é necessário que os probióticos resistam ao pH baixo do estômago (entre 2,5 e 3,5), sais biliares e ação de enzimas (lipase, amilase, pepsina, lactase entre outras). As matrizes lácteas são ricas em aminoácidos, assim agem aumentando a resistência e protegendo os probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. O leite possui ação tamponante, devido à presença de lipídios em sua composição. Ele age aumentando a tolerância dos probióticos ao pH baixo encontrado no estômago (KHORSHIDIANA, 2020).

Apesar de conseguir resistir à passagem pelo TGI, o *L. plantarum* não consegue se desenvolver adequadamente no leite, pois, não utiliza de forma eficiente substratos como proteínas e os açúcares presentes no leite (caseína e as demais proteínas do leite, e a lactose, respectivamente). Assim, o *L. plantarum* não secreta enzimas proteolíticas e, portanto, não consegue hidrolizar as proteínas e utilizar os aminoácidos do leite. Portanto, uma forma de aumentar a viabilidade do *L. plantarum* é realizar suplementação com fontes ricas em aminoácidos livres na matriz láctea, como por exemplo, o grão-de-bico (MA et al., 2016; HANG et al., 2020; NATH et al., 2020).

A farinha de grão-de-bico por sua vez, é rica em proteínas fontes de aminoácidos essenciais, aminoácidos livres (arginina), minerais, fibras e carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos) (RACHWA-ROSIK, 2015; MARGIER et al., 2018). O grão-de-bico possui em sua composição fibras, que são consideradas prebióticas, capazes de elevar o crescimento bacteriano e agregar valor nutricional as bebidas fermentadas (ZARE et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A partir do pressuposto de que o *L. plantarum* não consegue se desenvolver e se manter viável no leite, realizar a suplementação com a farinha de grão-de-bico rica em aminoácidos, pode fornecer os substratos necessários para o *L. plantarum* se desenvolver adequadamente e se manter viável durante o armazenamento.

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do leite fermentado com dois potenciais probióticos, *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7, enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de crescimento, bem como os parâmetros indicadores (pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e viabilidade) do leite fermentado por os potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 ou SBR64.7, enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico.

- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas (pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, estabilidade durante o armazenamento, capacidade de retenção de água e viabilidade) do leite fermentado por os potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 ou SBR64.7, enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico durante o período de 28 dias de armazenamento (a cada 7 dias).

- Avaliar a sobrevivência dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 no leite fermentado enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico, após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal.

- Avaliar a concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante do leite fermentado por os potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 ou SBR64.7, enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico.

3 REFERENCIAL TEORICO

3.1 Leite

O leite é oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, com vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite também deve ser denominado de acordo com a espécie que ele procede (MAPA, 2002). As glândulas mamárias são responsáveis por produzir o leite, que em sua composição possui nutrientes (lipídios, carboidratos, vitaminas, proteínas e minerais) que atendem as necessidades para o desenvolvimento da saúde humana. Ele também é importante na nutrição, hidratação, estabelecimento da flora intestinal e sistema imunológico. Normalmente o leite é consumido por mamíferos jovens, porém, os humanos são uma espécie que consomem o leite até a fase adulta. Em relação à produção global, há cinco espécies principais: 83% da produção total de leite advém de vacas, 13% búfalas, 2% cabras, 1% ovelhas e 0,4% camelas (FOROUTAN et al., 2019).

Um dos principais produtos do agronegócio brasileiro é o leite, é esperado que a sua produção cresça cerca de 20,9 % entre 2021 (36,3 bilhões de litros) e 2030 (43,9 bilhões de litros). A produção do leite bovino tem bastante representatividade e desempenha um papel de extrema importância, fornecendo cerca de 37,3% de proteínas consumidas por humanos. O leite bovino é o terceiro principal produto da pecuária brasileira, tendo uma grande relevância para o agronegócio, sendo assim, o leite é responsável por 5% do valor bruto da produção de toda a agricultura do país (CARRA et al., 2022; BACCHI, 2022).

Em relação à produção mundial, a Europa e a Ásia produzem dois terços do leite mundial. Já os Estados Unidos é o país com a maior produtividade (9000 kg de leite/vaca/ano). A produção mundial de leite é de 798 mil toneladas, sendo a Ásia o continente com maior volume. A Índia lidera o ranking, com 170 mil toneladas por ano, seguida dos Estados Unidos com 92,2 mil toneladas por ano. A produção leiteira no Brasil, atualmente, passa de 35 bilhões de litros por ano (HENRIQUE, 2020).

Na alimentação humana, o leite de vaca é o mais utilizado, arqueólogos encontraram evidências da extração e utilização do leite 9.000 a.C. Os povos sumérios foram os primeiros a criar gado e utilizavam o leite para alimentação e fabricação de manteigas. (PELLEGRINI et al., 2012). A capacidade de extrair o leite e consumi-lo até a fase adulta teve papel importantíssimo para a evolução da agricultura, estabelecimento e sobrevivência de povos e desenvolvimento de produtos secundários. Essa capacidade foi essencial para a saúde, crescimento, migração e sucesso dos humanos nos últimos 10.000 anos (FOROUTAN et al.,

2019). Com a revolução industrial, em meados do século XIX, houve um aperfeiçoamento das técnicas, assim fortalecendo a indústria de laticínios. Com essa modernização, surgiu o processo de pasteurização em 1864, esse processo foi e é importante para que as indústrias forneçam um produto mais seguro microbiologicamente (HENRIQUE, 2020).

Em relação a sua composição química, o leite é composto por aproximadamente 87,2% de água, 3,7% de gorduras, 3,5% de proteínas, 4,9% de lactose, 0,7% de cinzas e possui pH 6,8 (OLATUNJI et al., 2012). Essa composição pode variar de acordo com a raça, período de lactação, alimentação, idade e clima (SILVA et al., 2019). A composição química do leite o torna um substrato excelente para o crescimento de microrganismos contaminantes que podem vir do interior do úbere, superfícies externas do animal, equipamentos de manipulação do leite e outras fontes (WORKU et al., 2012).

Já no ponto de vista nutricional, o leite é uma excelente fonte de proteína, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais. A proteína do leite contém os nove aminoácidos essenciais para crescimento e desenvolvimento dos seres humanos. Os nove aminoácidos essenciais são histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (HUTH et al., 2006). As proteínas do leite são necessárias ao organismo humano para construir e reparar tecidos, e também para auxiliar na produção de anticorpos que circulam no sangue (JAVOID et al., 2009).

Alguns minerais encontrados no leite incluem cálcio, magnésio, fósforo, potássio, selênio, zinco, cobre, ferro, manganês e sódio. Os minerais do leite são utilizados no metabolismo humano de várias formas: cofator enzimáticos, formação óssea, equilíbrio hídrico e manutenção do corpo e transporte de oxigênio. Já a lactose e a gordura do leite são boas fontes de energia, enquanto as vitaminas do leite desempenham muitas funções no organismo humano que incluem como cofatores do metabolismo, precursores de hormônios e antioxidantes (ABERRA et al., 2013).

A partir do leite, é possível que haja utilização em agroindústrias alimentícias, ou até mesmo na culinária industrial. É possível produzir derivados lácteos, como por exemplo: queijo, manteiga, sorvete, iogurte, leite fermentado, leite condensado, creme de leite, leite em pó e doce de leite (HENRIQUE, 2020).

3.2 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (BALs) são caracterizadas como Gram-positivas, não esporuladas, catalase e oxidase negativa, anaeróbia facultativa e apresentam metabolismo fermentativo. Essas bactérias são detentoras de um grande potencial em relação a biopreservação de produtos alimentícios, podem ser encontradas no solo, na água, silagem, nas superfícies de plantas, no trato digestório, respiratório, boca e pele de animais e humanos, e também estão presentes no leite, vegetais e carnes. A grande maioria das BALs possuem status GRAS (Generally Recognized as Safe), por esse motivo, elas são bastante utilizadas por indústrias alimentícias, pois são seguras para consumo (LUNARDI et al., 2021; COSTA et al., 2019; KÖNIG, 2017).

As BALs são pertencentes ao filo Firmicutes e são representadas pela Ordem *Lactobacillales*, sendo esta Ordem dividida em 6 Famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Estas famílias são divididas em 6 gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Streptococo*. Entretanto, os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* são os mais conhecidos e utilizados pela indústria de alimentos. O filo *Actinobacteria* também contém representantes bacterianos que também apresentam capacidade de sintetizar o ácido láctico. Tais bactérias são representadas pelos gêneros *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* e *Bifidobacterium* (SAUER et al., 2017).

Recentemente, o gênero *Lactobacillus* precisou ser reclassificado, devido à extensão da diversidade do gênero original, com isso, se tornou difícil classificar, nomear e distinguir os diferentes Lactobacilos. Os novos 23 gêneros são *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* são os seguintes: *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agriactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* e *Secundilactobacillus* (AYIVI et al., 2020).

Pelo fato das BALs apresentarem metabolismo fermentativo são consideradas de grande importância para a indústria de alimentos fermentados. Tais bactérias podem ser classificadas como homofermentativas e heterofermentativas. As homofermentativas apresentam a capacidade de converter a glicose exclusivamente em ácido láctico, sendo este o único produto final. Já as heterofermentativas, além do ácido láctico são capazes de sintetizar

também ácido acético ou etanol e CO₂. As BALs homofermentativas, tais como, as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus* são utilizadas como culturas iniciadoras da fermentação na produção de alimentos, pelo fato de produzir o ácido láctico como único produto final da fermentação. Neste caso, garante-se uma fermentação mais rápida e conseqüentemente diminui o risco de contaminação. Já as culturas heterofermentativas, são utilizadas como culturas adjuntas. Por sintetizar compostos como diacetil e acetil, são importantes no desenvolvimento de flavor do produto. O diacetil tem um grande potencial aromático e de flavor que conferem características sensoriais aos alimentos (SILVA, 2022).

Algumas BALs são responsáveis por converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e gorduras em componentes que irão conferir qualidade nas características organolépticas. Elas também são bastante utilizadas como fermento láctico na produção de queijos, pois conferem características organolépticas (cor, sabor, aroma e textura) e agregam valor ao produto final (LUNARDI et al., 2021). Para que tenha efeito das BALs na qualidade do produto final é necessário que elas se mantenham viáveis, sua viabilidade pode ser afetada por fatores como condições de fermentação, temperatura de armazenamento, método de conservação e características inerentes da espécie utilizada. Essas condições são de extrema importância para que elas desempenhem suas funções (MOTTA, 2015).

As BALs geralmente são seguras para consumo humano (GRAS) e possuem uma dupla função na fermentação dos alimentos. Elas também são responsáveis por aumentar a vida útil dos produtos por meio da metabolização dos carboidratos, resultando em decréscimo do pH que cria um ambiente desfavorável para proliferação de microrganismos deterioradores e patogênicos. As BALs e as bacteriocinas, são responsáveis por conservar os alimentos, antagonizando patógenos e microrganismos deteriorantes, como *S. aureus* (PEREIRA, 2020; SILVA et al., 2020).

As bacteriocinas são pequenos peptídeos que foram sintetizados pelo ribossomo, e que possuem propriedades antimicrobianas. Elas são produzidas pelas BALs, com a finalidade de atacar outras bactérias Gram-positivas. Algumas bacteriocinas como a nisina e a pediocina são usadas como conservantes em alimentos, pois conseguem inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Essas bacteriocinas também auxiliam na competitividade das células produtoras, isso é importante para BALs que são utilizadas como culturas iniciadoras em produtos fermentados. O mecanismo de ação das bacteriocinas, assim

como a nisina, se dá por meio da ruptura da membrana celular, mediante a formação de poros ou de um efeito detergente. (MORA-VILLALOBOS et al., 2020).

As BALs homofermentativas, mais utilizadas pelas indústrias na produção de alimentos são as do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*, pois o ácido lático que é produzido por elas é usado como flavorizante, acidulante, tamponante e inibidor de bactérias deteriorantes em produtos lácteos. Já as bactérias heterofermentativas mais utilizadas são as do gênero *Weissella spp.* e *Leuconostoc spp.*, pois o ácido que é produzido por elas tem função aromatizante, e é utilizado em indústrias de laticínios como flavorizante, ela também é utilizada para fornecer uma melhor textura e sabor para os alimentos (LUNARDI et al., 2021).

As culturas lácticas também podem ser divididas em ácido-láticas starter ou iniciadoras, por serem capazes de metabolizar lactose, e culturas non starter, que também são conhecidas como adjuntas (LUNARDI et al., 2021). As culturas iniciadoras são microrganismos que serão adicionados na matéria-prima para que, por meio de suas atividades metabólicas, consigam realizar o processo de fermentação, tendo como resultado um produto final (GIRAFÁ, 2010).

Normalmente as culturas iniciadoras são utilizadas para a produção de ácido lático a partir da lactose, isso irá auxiliar na coagulação da proteína do leite, assim causando queda no pH. As BALs iniciadoras podem influenciar o sabor e textura dos produtos em que elas foram adicionadas, por meio da quebra de proteínas e gorduras, já a diminuição do pH certamente irá inibir microrganismos deteriorantes e patógenos. Em indústrias, quando é necessário realizar a fermentação, as cepas selecionadas são cultivadas em larga escala e incorporadas à matéria-prima. Essas culturas são denominadas culturas iniciadoras (GIRAFÁ, 2010).

As culturas iniciadoras mais utilizadas são do gênero: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (SILVA et al., 2020). Além da fermentação da lactose, as culturas iniciadoras também são fundamentais para a degradação da caseína em peptídeos e em aminoácidos livres. Ela é responsável pela biotransformação desses aminoácidos livres em uma diversidade muito grande de compostos aromáticos (LUNARDI et al., 2021).

As culturas non starter ou adjuntas, não fazem parte das culturas iniciadoras utilizadas pelas indústrias de laticínios, geralmente são encontradas no leite cru e sem algum processamento. Elas são representadas por espécies heterofermentativas de *lactobacilos* mesofílicos como *Lactobacillus casei spp.*, *L. paracasei spp.*, *L. rhamnosus spp.* e *L.*

plantarum spp. Também podem ser formadas por outros gêneros, como: *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Micrococcus* spp (PEREIRA, 2020).

Para as indústrias lácteas as BALs são de extrema importância, pois contribuem aumentando a vida de prateleira dos produtos (PEREIRA, 2020). Essas bactérias também são importantes pelo seu papel antimicrobiano, pois ao iniciar o processo de fermentação da lactose produz substâncias como ácido lático, diacetil e bacteriocinas que possuem função profilática, assim retardando e/ou inibindo os patógenos, logo, irá oferecer uma segurança aos alimentos (SILVA, 2022).

3.3 Bactérias lácticas probióticas

A palavra probiótico deriva da língua grega e significa “para vida”, ou seja, é um organismo que confere saúde ao hospedeiro. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; ZENBEBOODI et al., 2020). As BALs probióticas podem ser oriundas de diversas fontes, como por exemplo: alimentos fermentados, animais e humanos. Todavia, para que a cepa probiótica seja julgada para uso humano, ela deve ser isolada do sistema da microflora humana, e com uma alta capacidade de se aderir às paredes intestinais humanas. Além disso, ela deve ser segura e não apresentar riscos ao hospedeiro (AYIVI et al., 2020).

O conceito de probióticos foi mencionado primeiramente em 1908, quando o ganhador do Prêmio Nobel, Elie Metchnikoff propôs que a longevidade dos camponeses búlgaros era resultante do consumo de produtos lácteos fermentados. Em 1917 em meio a Primeira Guerra Mundial, Alfred Nissle fez o isolamento de uma cepa de *Escherichia coli*, não patogênica das fezes de um dos soldados que não teria desenvolvido enterocolite durante o surto de Shigelose. Esta estirpe foi intitulada *E. coli* Nissle 1917, e após isso foi utilizada no tratamento de salmonelose gastrointestinal e shigelose. Minoru Shirota, acreditava no potencial terapêutico das bactérias na modulação da microflora intestinal. Em 1930, ele isolou e cultivou uma cepa de *Lactobacillus* que foi capaz de sobreviver à passagem pelo TGI. Essa bactéria foi nomeada *Lactobacillus casei* cepa *shirota* (A.MIZOCK et al., 2015).

O termo “probiótico” foi utilizado pela primeira vez por Lilly e Stillwell, (1965), eles descreveram como substâncias secretadas por um organismo que estimula o crescimento de outro. Parker, (1974) descreveu os probióticos como organismos que contribuem para que haja um balanço da microbiota intestinal e Fuller, (1989) caracterizou os probióticos como

suplementos alimentares microbianos vivos que são benéficos ao hospedeiro e contribuem para a melhora de sua microbiota.

Em 1899, Henry Tissier (Instituto Pasteur, na França) fez o isolamento de bifidobactérias presentes em fezes de bebês amamentados, e pôde perceber que essas bactérias eram componentes predominantemente da microflora intestinal humana. Assim, ele propôs que fosse administrado bifidobactérias a crianças com o diagnóstico de diarreia, pois ele acreditava que as bifidobactérias iriam deslocar as bactérias proteolíticas e se restabeleceram como microrganismos intestinais dominantes (AYIVI et al., 2020).

Mais tarde, El-Soud et al., (2015) confirmou a recomendação de Tissier. Em seu estudo, El-Soud complementou a fórmula láctea com *Bifidobacterium lactis* para crianças diagnosticadas com diarreia aguda. Foi comprovado que a terapia reduziu de modo significativo a frequência e duração da doença, e diminuiu também o período de hospitalização das crianças.

Pesquisas realizadas pela empresa Ganeden (referência mundial de produtos probióticos) mostraram que a estimativa de crescimento do mercado global de probióticos será de \$69 bilhões com uma taxa anual de 7% até o ano de 2023. A América Latina é a região que demonstrou maior consumo de produtos com probióticos, em destaque o Brasil, que representa 52% do mercado latino-americano, seguido pelo México com 28%. O Brasil é o maior mercado e tem o maior potencial de expansão, cerca de 11% até 2022 (HILACHUK, 2022).

Os probióticos autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA para uso em suplementos alimentares em adolescentes e adultos, exceto para lactentes (0 a 12 meses) ou crianças de primeira infância (1 a 3 anos) são:

PROBIÓTICOS	LIMITES MÍNIMOS DEVEM SER FORNECIDOS PELOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES NA RECOMENDAÇÃO DIÁRIA DE CONSUMO ≥ 19 ANOS
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12 (DSM 15954)	1 x 10 ⁹ UFC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 (ATCC SD5674)	2 x 10 ⁹ UFC
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM (ATCC SD5221)	1 x 10 ⁹ UFC
<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 (KCTC 10902BP)	1 x 10 ¹⁰ UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001 (ATCC SD5675)	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	1 x 10 ¹⁰ UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (DSM 33156)	1 x 10 ¹⁰ UFC
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	1 x 10 ⁸ UFC
Associação de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011 (CNCM I-1720) e de <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 (CNCM I-1722)	8 x 10 ⁹ UFC, sendo 7,6 x 10 ⁹ UFC de <i>L. rhamnosus</i> e 4 x 10 ⁸ UFC de <i>L. helveticus</i>
Associação de <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 (CNCM I-1722) e de <i>Bifidobacterium longum</i> R0175 (CNCM I-3470)	3 x 10 ⁹ UFC, sendo 2,7 x 10 ⁹ UFC de <i>L. helveticus</i> e 3 x 10 ⁸ UFC de <i>B. longum</i>
Associação de <i>Bifidobacterium lactis</i> BI-07 (ATCC SD5220), de <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM (ATCC SD5221), de <i>Bifidobacterium lactis</i> BI-04 (ATCC SD5219) e de <i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37 (ATCC SD5275)	1,7 x 10 ¹⁰ UFC, sendo 4,25 x 10 ⁹ UFC para cada linhagem

Figura 1 Probióticos autorizados pela ANVISA para adolescentes e adultos

Fonte: Adaptado ANVISA, (2020).

Já os indicados para lactentes (0 a 12 meses) ou crianças de primeira infância (1 a 3 anos) são os:

PROBIÓTICOS	LIMITES MÍNIMOS DEVEM SER FORNECIDOS PELOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES NA RECOMENDAÇÃO DIÁRIA DE CONSUMO
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB12 (DSM 15954)	1 x 10⁹ UFC
<i>Bifidobacterium lactis</i> NCC 2818	1 x 10⁹ UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	1 x 10¹⁰ UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (DSM 33156)	1 x 10¹⁰ UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001 (ATCC SD5675)	6 x 10⁹ UFC
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	1 x 10⁸ UFC

Figura 2 Probióticos autorizados pela ANVISA para lactentes (0 a 12 meses) ou crianças de primeira infância (1 a 3 anos).

Fonte: Adaptado ANVISA, (2020).

A maioria dos probióticos disponíveis para comercialização são pertencentes ao grupo das BALs, principalmente os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, devido ao seu histórico de segurança (PACHECO et al., 2010).

Para uma bactéria láctica ser considerada probiótica, é necessário ter status GRAS (Generally Recognized as Safe), apresentar tolerância às condições de estresse do trato gastrointestinal, como, por exemplo, o pH ácido do suco gástrico, a pepsina, a protease duodenal e os sais biliares. Também deve apresentar capacidade de aderir ao epitélio intestinal e apresentar atividade antimicrobiana. Além disso, é importante que ele seja resistente a antibióticos e não possua efeitos adversos à saúde (SHOKRYAZDAN et al., 2017; COSTA et al., 2019).

A RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018, relata que para ser considerado um probiótico ele deve ter: histórico de uso seguro, ausência de registros de eventos adversos relevantes, devem ser obtidos a partir de estudos clínicos ou vigilância pós-uso, ausência de fatores de

virulência e patogenicidade relevantes para a saúde humana, ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana, ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde humana e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (ANVISA, 2018).

De acordo com a FAO/OMS, para ser considerado um probiótico, é necessário que o microrganismo tenha identificação internacionalmente conhecida; resista à acidez do estômago e bile; seja benéfico ao hospedeiro (com resultados obtidos in vivo e in vitro); tenha segurança comprovada e que se mantenha viável até o consumo. Já o teor de células viáveis e vivas na porção do alimento recomendado para consumo diário deve ser de 10^9 UFC/porção diária até o fim do prazo de validade do produto, com incerteza de 0,5 log (FAO/OMS, 2012).

Vários benefícios dos probióticos à saúde têm sido relatados na literatura, tais como, realizar a manutenção da microflora intestinal, fornecer uma proteção contra patógenos, reforçar o sistema imunológico, reduzir a pressão arterial, e fornecer uma utilização mais eficiente dos nutrientes, assim, melhorando o valor nutricional dos alimentos. Além disso, eles também são capazes de realizar a hidrólise da lactose, modulação da constipação, atividade antimutagênica e anticarcinogênica, melhora do quadro de pacientes com diabetes tipo 2 (resistência à insulina) e obesidade. É importante ressaltar que estes benefícios são obtidos por linhagens probióticas específicas, e não por gêneros específicos. Cada linhagem está relacionada a um benefício, portanto, nenhuma cepa irá fornecer todos estes benefícios (COSTA et al., 2013; TRIPATHI, 2014).

Zendeboodi et al., (2020) cita vários efeitos benéficos dos probióticos, entre eles, os que se destacam são: agregar e aumentar o valor nutricional dos alimentos, controlar e reduzir o colesterol sérico, prevenir e retardar infecções intestinais, ceifar a diarreia associada a antibióticos, reduzir os sintomas que estão associados a intolerância à lactose, diminuir o risco de câncer de cólon e melhora na digestão da gliadina. Em seu estudo, Han et al., (2021) relatam que os probióticos são benéficos no tratamento e prevenção de doenças crônicas, infecciosas, autoimunes e pediátricas.

Para ser um microrganismo probiótico é necessário que ele seja de origem humana (também são aceitos de diferentes nichos ecológicos), não patogênico, seja resistente ao processamento, ser resistente a bile, ter adesão às células epiteliais, capacidade de sobreviver às condições do trato gastrointestinal e capacidade de estimular a atividade no local de adesão (trato gastrointestinal). A grande maioria dos estudos que abordam os probióticos e a sua

utilização estão focados no trato gastrointestinal, pois, é lá que os probióticos competem com outros microrganismos para conseguir se aderir, eles também são capazes de produzir compostos antimicrobianos, sendo esse processo denominado de “resistência à colonização” (PEREIRA, 2019).

Dentre os mecanismos de ação dos probióticos pode-se citar a interação com o epitélio intestinal, produção de ácidos orgânicos, exclusão competitiva, produção de moléculas que possuem efeitos sistêmicos e competição contra bactérias patogênicas. Além disso, eles competem por nutrientes nos locais de adesão, produzem metabólitos antimicrobianos e alteram as condições ambientais. Os probióticos possuem, resumidamente, três modos de ação: (I) eles conseguem modular o sistema imunológico inato e adquirido, assim, conseguem agir na prevenção de doenças infecciosas e inflamações crônicas do TGI. (II) os probióticos impactam diretamente os microrganismos patogênicos, com isso, consegue restituir o equilíbrio microbiano no intestino. (III) os probióticos também podem estar ligados a atividades que irão afetar os produtos microbianos (toxinas e sais biliares), com isso, ocorrerá a inutilização destas toxinas, levando a desintoxicação do intestino. Os probióticos também inibem o crescimento de bactérias patogênicas, por meio da liberação de peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas e reuterina) e secretam imunoglobina A que irá auxiliar na imunidade humoral intestinal (SANDERS, 2018; AYIVI et al., 2020).

As BALs são capazes de produzir ácidos graxos de cadeia curta e peróxidos que retardam e até mesmo impedem o crescimento de patógenos (por inibição competitiva) em produtos lácteos. Essas bactérias também conseguem interagir com as células do epitélio intestinal e células imunológicas, assim desencadeando sinais imunológicos (GUPTA, 2009). O registro na ANVISA é obrigatório para substâncias bioativas, probióticos e alimentos com propriedades funcionais (ANVISA, 2000).

3.4 *Lactobacillus plantarum*

O *Lactobacillus plantarum* foi denominado inicialmente como *Streptobacterium plantarum* por Orla-Jensen e Holland (1919), e descrito por Pederson (1901) como uma BaL capaz de usar vegetais como substrato. O *L. plantarum* é um microrganismo Gram-positivo, possui morfologia de bastonete, é anaeróbio e heterofermentativo facultativo. Essa espécie tem status GRAS (Generally Recognized as Safe) e possui diversas cepas que foram isoladas de diferentes nichos ecológicos (diferentes materiais vegetais, carne, peixe, frutas, legumes, leite, silagem, produtos de cereais, nascente e águas residuais, e no estômago de humanos e

animais). Devido a sua alta capacidade de adaptação em diferentes ambientes, o *L. plantarum* tem sido nomeado como "nômade", pois ela consegue se transferir do ambiente para o homem e vice-versa. A cepa *L. plantarum* é mesófila, com crescimento em temperaturas a partir de 15°C até 45°C (TODOROV, 2010; SOUZA et al., 2013).

As espécies do gênero *Lactobacillus* são microrganismos dominantes, que podem ser encontrados na nutrição humana e também na microbiologia alimentar, principalmente, em alimentos fermentados (BEHERA, 2018).

Domínio: Bactérias
Filo: Firmicutes
Classe: Bacilos
Ordem: Lactobacillales
Família: Lactobacillaceae
Gênero: <i>Lactobacillus</i>
Espécie: <i>Lb. plantarum</i>

Figura 3 Classificação taxonômica de *Lactobacillus plantarum*

Fonte: Adaptado BEHERA, (2018).

A utilização do *L. plantarum* tem sido feita em diversos produtos alimentícios, como vegetais fermentados, cereais, carnes, peixes, laticínios e produtos de bebidas e alimentos fermentados. Ele contribui com a formação das propriedades organolépticas (sabor e textura), além disso, ele também produz ácido lático, ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético) e algumas cepas apresentam capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos como as bacteriocinas, assim contribuindo para a segurança dos alimentos. Entretanto, a ANVISA não reconhece o *L. plantarum* como probiótico, mesmo ele sendo utilizado em diversos outros países da União Europeia (Alemanha, França, Itália), e pelos Estados Unidos (SOUZA et al., 2013; LIU, 2018; HANG et al., 2020).

O microrganismo *Lactobacillus plantarum* é utilizado por indústrias, pois, é tolerante à acidez, sais biliares, consegue sobreviver à passagem pelo TGI e é seguro para consumo de humanos e animais. Ele sobrevive ao pH ácido do estômago e duodeno, resiste aos ácidos biliares no intestino delgado e conseguem colonizar no TGI para poder aderir-se à mucosa. Para ser considerado probiótico, sua taxa de sobrevivência não deve ser inferior a 10^6 UFC/g. O *L. plantarum* é utilizado no tratamento da síndrome do intestino irritável, também auxilia na distensão abdominal e flatulência. Além disso, há indícios que algumas cepas de *L. plantarum* possuem efeito modulador do sistema imunológico (BIXQUERT, 2009; SUNANLIGANON et al., 2012; MA et al., 2016; HAMEED et al., 2021).

Algumas cepas de *L. plantarum* possuem funções benéficas *in vivo*, como por exemplo: regulação do sistema imunológico, melhora no quadro de intolerância à lactose, inibição de patógenos intestinais, prevenção de doenças cardiovasculares, redução do colesterol, controle de ganho de gordura corporal e redução de inflamação. Diante disso, é notório que essas cepas possuem potencial para serem usadas como probióticos funcionais (BIXQUERT, 2009; SUNANLIGANON et al., 2012; MA et al., 2016; HAMEED et al., 2021).

Os produtos lácteos e o leite, em específico, são adequados para o crescimento de BAIs, porém, as cepas de *L. plantarum* não conseguem se desenvolver de forma adequada no leite sem suplementação. O seu crescimento é dependente de sua capacidade de usar os substratos no leite bovino, como caseína e lactose, porém, o *L. plantarum* não consegue utilizar com eficiência estes ingredientes do leite. Diante do pressuposto, é importante realizar a suplementação do leite fermentado com *L. plantarum* para obter resultados satisfatórios. Estudos recentes vêm tentando estimular o crescimento e acidificação do *L. plantarum* no leite, por meio de suplementos promotores de crescimento. Fontes de vitaminas, antioxidantes, compostos bioativos, minerais e aminoácidos conseguem auxiliar no crescimento e rendimento do *L. plantarum* (MA et al., 2016; HANG et al., 2020; NATH et al., 2020).

Em seu trabalho, Ma et al. (2016) citou os nutrientes essenciais necessários para a fermentação do leite por *L. plantarum* (*L. plantarum* ST-III, *L. plantarum* WCFS1 e *L. plantarum* LPHS) e relatou que os *L. plantarum* não cresceram adequadamente no leite sem suplementação. Para ele crescer adequadamente, é necessário fortificar o leite com seis aminoácidos (isoleucina, leucina, valina, tirosina, metionina e fenilalanina) e adenina. As contagens viáveis de *L. plantarum* no leite fermentado suplementado com 0,1 g/L de adenina

e 0,2 g/L de aminoácidos foram 8,34 e 9,18 UFC/g em 24 e 48 h de fermentação. Já o tratamento controle foram apenas 7,65 e 7,59 UFC/g em 24 e 48 h, respectivamente. Estudos revelaram que o leite fermentado age como matriz carreadora das cepas de *L. plantarum*, desta forma, há uma maior carga bacteriana probiótica na hora do consumo. Porém, há uma redução dessa carga durante a passagem pelo TGI, logo, a dose diária recomendada é de 10^8 a 10^9 UFC/g (HANG et al., 2020; NATH et al., 2020).

Li et al. (2017) estudaram sobre a influência do *L. plantarum* IMAU80106, IMAU10216 e IMAU70095 nas propriedades de fermentação do iogurte. Ele concluiu que o leite fermentado é uma matriz carreadora adequada para o crescimento de *L. plantarum* IMAU80106, IMAU10216 e IMAU70095. As contagens de probióticos viáveis estão em níveis adequados (pelo menos 10^6 UFC/g). Já Souza et al. (2013) produziram um leite fermentado com *L. plantarum* BG112 e avaliou-se seu comportamento microbiológico, físico-químico e sensorial durante 70 dias de armazenamento. A contagem de *L. plantarum* BG112 variou de 10,1 a 8,9 log UFC mL⁻¹, no início e final do armazenamento, sua viabilidade ficou acima do mínimo exigido pela legislação brasileira alimentar, que possui alegações de propriedades funcionais e/ou sanitárias para que possa ser caracterizado como alimento probiótico. O autor conclui que, o *L. plantarum* BG112 apresentou ótima viabilidade em leite fermentado, e que por mais que ele não seja considerado probiótico pela legislação brasileira, ele é promissor na produção de alimentos com propriedades funcionais e/ou sanitárias.

3.5 Leite fermentado probiótico

Desde os primórdios, leites fermentados são conhecidos por serem saudáveis. O processo de fermentação é bem antigo, foi desenvolvido a milhares de anos atrás, os povos antigos faziam isso a fim de conservar os alimentos para tempos de escassez. Os cientistas Hipócrates, acreditavam que o leite fermentado não era apenas um produto alimentar, mas era também um medicamento. O leite fermentado era utilizado no tratamento e cura de distúrbios do intestino e estômago (BELL, 2017; AYIVI et al., 2020).

Para que ocorra a fermentação do leite é importante utilizar BALs que irão liberar peptídeos potencialmente bioativos. Esse processo pode acontecer com BALs dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Enterococcus* também são utilizadas no processo de fermentação do leite, pois contribuem para a saúde dos consumidores, porém são utilizadas em menor escala, pois as *Bifidobacterium* apresentam crescimento lento e as *Enterococcus* possuem

algumas estirpes com histórico de patogenicidade (MORAES et al., 2022). O leite fermentado é benéfico à saúde e tem efeito anti-hipertensivo, antidiabético e anticancerígenos (KHORSHIDIANA, 2020).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007 do MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, entende-se como leite fermentado produtos que podem ser adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas a partir da coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, e pode ser adicionado ou não de outros produtos lácteos por ação de microrganismos específicos. O processo de fermentação pode ser realizado com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp*, *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* e/ou outras BALs que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (MAPA, 2007).

De acordo com o conteúdo de matéria gorda, os leites fermentados se classificam em: Com creme (base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda mínima de 6,0g/100g); integrais (base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda mínima de 3,0g/100g); parcialmente desnatados (base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda máxima de 2,9g/100g) e desnatados (base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda máxima de 0,5g/100g). Quando há a adição de ingredientes opcionais não lácteos (frutas, sucos, polpas e cereais), antes, durante ou depois da fermentação, até um máximo de 30% m/m, classificam-se como leites fermentados com adições. Para ser considerado leite fermentado probiótico, é necessário que a estirpe bacteriana que resultou a fermentação seja probiótica. A contagem de BALs totais do leite fermentado deve ser no mínimo 10^6 UFC/g. Os microrganismos dos cultivos utilizados devem ser viáveis, ativos, abundantes e estar em concentração igual ou superior àquela citada anteriormente no produto final e durante seu prazo de validade (MAPA, 2007).

Santos et al. (2017) utilizou o extrato de bagaço de uva (15 e 17 g) no leite de cabra fermentado por um período de 28 dias, contendo os probióticos *L. acidophilus* LA-5 e *L. rhamnosus* HN001. O extrato demonstrou efeito protetor na viabilidade de *L. acidophilus*, isso devido aos seus compostos polifenólicos com propriedades antioxidantes. No entanto, após 14 dias de armazenamento, as populações de *L. acidophilus* foram significativamente menores quando comparadas às de *L. rhamnosus*, e, apenas o *L. rhamnosus* manteve sua viabilidade acima de 7 log UFC mL⁻¹ durante todo o período investigado.

Em outro estudo, foi adicionado polpas de várias espécies de *Annona* ao iogurte probiótico por um período de 28 dias de armazenamento, a polpa não demonstrou efeitos significativos em relação à contagem das bactérias, porém, ela manteve a viabilidade do probiótico *B. animalis ssp. lactis* Bb-12 (manteve o mínimo terapêutico recomendado de 10^6 UFC/ml ao longo de 28 dias de vida útil) e aumentou significativamente a atividade antioxidante do iogurte, que apresentou maiores atividades antioxidantes no primeiro dia de armazenamento em relação ao controle (SENADEERA et al., 2018).

Em seu estudo, Abdel-Hamid et al. (2020) realizaram uma suplementação do iogurte com extrato da fruta *Siraitia grosvenorii* (0,5%, 1% e 2%) e, puderam verificar que houve aumento na contagem de *L. casei* (as contagens variaram de 7,84 log UFC/g a 8,88 log UFC/g) e *L. bulgaricus* (as contagens variaram de 8,16 log UFC/g a 8,83 log UFC/g). Já *S. thermophilus* não houve diferença significativa após 1 dia de armazenamento. O iogurte probiótico com 2% de extrato da fruta apresentou as maiores atividades antioxidantes.

Al-Hindi (2020) em seu trabalho, produziu uma a bebida láctea fermentada com 150 mg/L e 300mg/L de extrato de casca de romã suplementada com os potenciais probióticos *L. plantarum* DMSZ 20079 e *B. longum* DSMZ 200707. Todas as cepas sobreviveram após 0, 7, 14, 21 e 30 dias de armazenamento. Em particular, a população de *L. plantarum* DMSZ 20079 diminuiu ligeiramente de 9,33 log UFC/mL para 8,02 log UFC/mL (300 mg/L de extrato de casca de romã). A densidade celular de *Bifidobacterium longum subsp. longum* diminuiu de 9,40 log para 7,58 log UFC/mL. Os potenciais probióticos tinham o mínimo exigido de log 7,00 UFC/mL aos 30 dias de armazenamento.

As cepas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* mantiveram-se viáveis ($10^7 - 10^8$ UFC/mL) em iogurte probiótico contendo polpa de açaí (3, 5 e 7%) com 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento (ALMEIDA et al., 2008). Já Santo et al., (2010) adicionou 7% de polpa de açaí antes da fermentação e constatou que houve aumento na viabilidade dos probióticos *L. acidophilus* L10 (7,65 log UFC/mL), *B. animalis ssp. lactis* B104 (9,36 log UFC/mL) e *Bifidobacterium longum* B105 (5,42 log UFC/mL) ao longo de 4 semanas de armazenamento. Já o leite fermentado suplementado com 1% fibra de limão e laranja demonstrou aumento na contagem dos probióticos *L. acidophilus* CECT 903 e *L. casei* CECT 475 (contagens de todas as populações microbianas foram superiores a 6 log UFC/mL) todas as populações aumentaram após 30 dias de armazenamento refrigerado, porém com o probiótico *B. bifidum* CECT 870 não houve diferença significativa, isso se deve pela sua sensibilidade ao ácido ambiente. O autor relatou que a presença de fibra cítrica em leites fermentados elevou o

crescimento bacteriano e a sobrevivência das bactérias probióticas testadas (SENDRA et al., 2008).

3.6 Farinha de grão-de-bico

O grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) é uma planta de produção anual e advém da família Fabaceae. Ela é cultivada em regiões temperadas e semiáridas (Ásia, Europa, Austrália e América do Norte). Um dos principais países produtores de grão-de-bico é a Índia (66%), logo em seguida, vem a Turquia (7,6%), Paquistão (7%) e Irã (3,5%). Consumir grãos de leguminosas diminui os riscos de doenças cardiovasculares e degenerativas. Há duas variedades de grão de bico, *Kabuli* e *Desi*. A variedade *Desi* é cultivada em terras semiáridas e possui grãos pequenos, escuros e rugosos. Já a variedade *Kabuli* é maior que a *Desi*, possui uma fina cobertura e é cultivada em climas temperados. As diferenças entre elas e a composição nutricional, pode ser afetada por fatores como: região de cultivo, condições de cultivo e duração da estação de crescimento da planta (RACHWA-ROSIK, 2015; MARGIER et al., 2018).

Os grãos maduros podem ser utilizados para fabricação de farinha, ou como substituto do café. Esses grãos também podem ser cozidos e adicionados a saladas. Quando se compara a farinha de trigo convencional e a farinha de grão-de-bico, nota-se, que a farinha de grão-de-bico possui maiores teores de proteína, gordura, cinzas e fibras. Ela também é rica em minerais, como: potássio, cálcio, sódio, magnésio, cobre, ferro e zinco. Em relação a aminoácidos, os aminoácidos essenciais estão em maior quantidade na farinha de grão-de-bico, do que na farinha de trigo (56,55 e 32,20 g/100g de proteína).

A proteína do grão do grão-de-bico possui cerca de 0,36 g/100g de isoleucina; 0,48 g/100g de leucina; 0,91 g/100g de lisina; 0,12 g/100g de metionina; 0,42 g/100g de fenilalanina; 0,06 g/100g treonina; 0,38 g/100g de valina e 0,19 g/100g de tirosina. Já a farinha de grão-de-bico possui cerca de 4,25 g/100g de isoleucina; 6,96 g/100g de leucina; 2,14 g/100g de lisina; 2,00 g/100g de metionina; 1,33 g/100g de cisteína; 4,48 g/100g de fenilalanina; 2,60 g/100g treonina; 4,94 g/100g de valina e 3,50 g/100g de tirosina. Os carboidratos monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos são abundantes na farinha de grão-de-bico (RACHWA-ROSIK, 2015; MARGIER et al., 2018).

A seguir, há uma figura com a composição química da farinha de trigo e grão de bico.

Componente	Farinha de trigo	Farinha de grão-de-bico
Proteína	9,3 – 14,3	24,4 – 25,4
Carboidrato	64,6 – 69,04	47,4 – 55,8
Fibra	0,9 – 1,8	3,9 – 11,2

Figura 4 Composição química da farinha de trigo e grão-de-bico (%).

Fonte: Adaptado RACHWA-ROSIK, (2015).

Em geral, as leguminosas possuem carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas indispensáveis para a dieta e saúde humana, esses nutrientes também são de extrema importância para o crescimento de culturas probióticas. A suplementação do leite é um método necessário para auxiliar o crescimento de culturas lácticas e probióticas no leite fermentado, além de auxiliar no crescimento e de culturas, a fortificação do leite aumenta propriedades nutricionais e pode ser feita com fontes alimentares como: frutas, nozes e grãos. Leguminosas como o grão-de-bico, podem constituir uma fonte excelente de componentes prebióticos, para a suplementação em bebidas probióticas. As leguminosas também podem melhorar a formulação do leite fermentando no ponto de vista nutricional, e aumentar o crescimento bacteriano (ZARE et al., 2012).

O trabalho de Hussein et al. (2020) teve como objetivo analisar o efeito do grão de bico como agente prebiótico, antioxidante e espessante na viabilidade probiótica e propriedades físico-químicas do bio-iogurte. Foi utilizado as culturas probióticas *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 e uma mistura de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* e *Lactobacillus acidophilus* (SACOO Lyofast (AB1)) com adição de farinha de grão de bico (1, 2 e 3%) durante o período de armazenagem de 21 dias. A farinha estimulou e auxiliou o crescimento dos probióticos, a contagem bacteriana foi de 8,28 log, 8,12 log, 8,04 log e 7,32 log UFC/g com 3, 2, 1% de farinha de grão de bico e controle, respectivamente, aos 21 dias de armazenamento. A farinha de grão de bico pode substituir o leite em pó, nas concentrações de 1 ou 2%. O autor concluiu que a farinha de grão de bico aumentou a contagem dos probióticos durante os 21 dias, assim mostrando que o grão de bico é um importante para as BALs, em produtos lácteos fermentados, pois, ele promove o aumento do crescimento de bactérias probióticas e aumento da capacidade antioxidante.

Fu, (2013), produziu uma bebida acrescentada de extrato de grão de bico e leite reconstituído (1:1 v/v), as culturas utilizadas foram *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Após a fermentação a contagem bacteriana foi de 2,4 x 10⁹ UFC/mL.

3.7 Efeito protetor do leite fermentado a estirpes probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal

As bactérias probióticas que estão presentes nos alimentos são expostas às diversas condições adversas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), isso inclui a acidez do estômago e ação dos sais biliares que possuem ação das enzimas enteroquinase, lipase, amilase, lactase e sacarase. Essas bactérias probióticas precisam sobreviver principalmente a alta acidez do estômago para chegar ao cólon em quantidades adequadas e viáveis, assim irá conseguir se aderir ao epitélio intestinal, tornando-se benéfica para quem as consome. Para isso ser possível, é necessário que a matriz condutora exerça papel protetor e mantenha as bactérias viáveis durante a passagem pelo TGI (CASAROTTI, 2015; NAZZARO et al., 2012).

As matrizes lácteas são matrizes carreadoras que auxiliam no transporte e proteção dos probióticos, pois, são fontes de aminoácidos e aumentam a resistência destes microrganismos ao estresse que é a passagem pelo TGI. O leite também possui uma capacidade tampão, isso devido a sua quantidade de gordura. Isso faz com que o probiótico consiga tolerar as condições adversas do TGI (KHORSHIDIANA, 2020). O leite fermentado é um excelente veículo de base alimentar, para fornecer proteção às bactérias probióticas. Porém, há alguns fatores que são capazes de afetar a viabilidade dos probióticos, dentre esses fatores pode-se citar: ingredientes que são utilizados na fabricação do produto, polpas de frutas, interações entre as culturas iniciadoras e adjuntas, adição de leveduras e o pH do leite fermentado (CASAROTTI, 2015).

É necessário avaliar a sobrevivência desses probióticos em condições desfavoráveis que simulem o TGI, e avaliar também, sua viabilidade durante sua vida de prateleira. Algumas alternativas estão sendo utilizadas a fim de aumentar a sobrevivência dos probióticos no TGI, como por exemplo: microencapsulação, suplementação do leite e uso de uma matriz alimentar adequada com função protetora (CASAROTTI, 2015). Para ser eficaz e benéfico à saúde é necessário que os probióticos sobrevivam à passagem pelo TGI (BURNS et al., 2010). As bactérias probióticas devem resistir ao pH baixo no estômago (entre 2,5 e 3,5) e resistir a atividade antimicrobiana da pepsina, que é uma barreira contra a entrada de bactérias no TGI. Para determinação da tolerância ácida *in vitro* de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são utilizados normalmente valores de pH entre 1 e 5. Já os sais biliares entre 0,15% e 0,3%, isso é feito para selecionar as bactérias probióticas para humanos (ARAÚJO et al., 2010).

Para conseguirem sobreviver ao trânsito gastrointestinal e colonizarem no intestino, as bactérias devem resistir aos sais biliares. Esses sais biliares são substâncias biológicas que são semelhantes a detergentes sintetizados no fígado. As enzimas são responsáveis por conjugar os ácidos biliares livres recém-sintetizados no fígado com o aminoácido taurina, isso irá gerar sais biliares conjugados. Os sais biliares ficarão armazenados na vesícula biliar, e serão liberados no duodeno durante o processo de digestão. Esses sais biliares possuem uma grande atividade antimicrobiana, que desestrutura a membrana celular, por isso, é importante que as bactérias desenvolvam mecanismos de defesa e consigam resistir aos sais biliares. Apesar de sua importância no processo de digestão, a bile é tóxica para a maioria dos microrganismos, a camada fosfolipídica presente na membrana das bactérias faz com ela se torne alvo da ação da bile. Ter tolerância à bile é um dos critérios mais importantes, para que a bactéria tenha papel funcional como probiótico (RUIZ, 2013).

Quando os probióticos são administrados via oral, esses passam por condições adversas como o ácido gástrico, sais biliares e algumas enzimas. Após passarem por essas condições, devem chegar viáveis no cólon e conseguir se aderir e colonizar a mucosa. Assim que são ingeridos, passam por um trajeto que vai da boca até o cólon, essa passagem pelo TGI pode afetar a viabilidade dos probióticos. Na boca, os probióticos são expostos à saliva, porém, a saliva não influencia significativamente a taxa de sobrevivência dos probióticos. Após isso, os probióticos vão para o estômago e serão expostos ao suco gástrico ácido que é letal para a maioria das bactérias. A passagem pelo estômago pode durar de 5 minutos a 2 horas, e a exposição pode ser fatal para os probióticos. Além do suco gástrico, os probióticos devem resistir a atividade enzimática e agitação mecânica do estômago (HAN et al., 2021).

O próximo local de passagem é o intestino delgado, onde há presença de suco pancreático e bile. Apesar do intestino delgado ter um pH neutro 6,0-7,0 há a existência de enzimas digestivas (lipase, protease e amilase) que podem afetar a viabilidade dos probióticos, por meio da ruptura de sua membrana celular e danos ao DNA. Por último, os probióticos passam pelo cólon onde há a maior densidade bacteriana (10^{11} a 10^{12} UFC/ml) por esse motivo, os probióticos terão resistência à colonização, onde irão competir com a microbiota do hospedeiro por nutrientes e locais de adesão, para que, por fim, consigam se aderir e colonizar na mucosa. Essa resistência à colonização faz com que boa parte dos probióticos seja excretado para fora do cólon com as fezes (HAN et al., 2021).

Em um estudo realizado por Casarotti (2015) foi avaliado o efeito da adição de farinha de maçã, banana e uva (1%) nas características do leite fermentado. A suplementação com as

farinhas melhorou a tolerância do *Lactobacillus acidophilus* La-5 a condições gastrointestinais simuladas e apenas a farinha de banana apresentou efeito protetor sobre *Bifidobacterium animalis subsp.lactis* BB-12 após o período de armazenamento de 28 dias.

Araújo et al. (2010) realizaram um trabalho onde foi desenvolvido um queijo cottage simbiótico contendo *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e inulina. O estudo tinha como objetivo avaliar a sobrevivência desta bactéria quando o queijo for exposto a condições simulando aquelas encontradas no trato gastrointestinal. Durante o período de prateleira as células probióticas se mantiveram acima do recomendado, contendo 5% de inulina, e as bactérias probióticas apresentaram boa sobrevivência as condições simuladas do TGI (baixos valores de pH e a altas concentrações de sais biliares).

Leandro et al., (2021) relataram em seu estudo, que a cepa *L. plantarum* SBR64.7 obteve a menor redução de viabilidade, quando exposta ao suco gástrico (pH 2,0) e pancreático (1,0% de sais biliares), isso indica que a cepa é promissora e pode ser caracterizada como potencial probiótico.

Valero-Cases. (2017) observou o efeito prebiótico com diferentes concentrações de inulina (0, 1 e 2%) no crescimento e sobrevivência de *L. plantarum* CECT 220, em sucos fermentados adicionados de cenoura e laranja durante 30 dias de armazenamento. O *L. plantarum* CECT 220 se manteve viável após digestão in vitro em ambos tratamentos, porém, o suco fermentado com 2% de inulina no 30º dia de armazenamento se sobressaiu em relação a sobrevivência e viabilidade da bactéria com 7,40 LOG UFC/mL. O suco de cenoura e laranja fermentado pode ser uma boa matriz para a entrega de *L. plantarum* em altas concentrações (maior que 10⁶ UFC/mL) no cólon.

Diniz-Silva et al. (2019), analisaram a sobrevivência do probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA-05 em queijo Minas frescal com óleo de orégano e alecrim. O *Lactobacillus acidophilus* LA-05 se manteve viável durante os 21 dias de armazenamento (7 LOG UFC/g) após digestão in vitro. Os óleos apresentaram atividade antimicrobiana, isso interferiu de forma negativa na viabilidade do probiótico, em contrapartida, a atividade de água do queijo favoreceu a viabilidade do probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA-05.

Furtado et al. (2019) avaliaram a viabilidade e a resistência das cepas *Lactobacillus acidophilus* La-05, *Lactobacillus plantarum* LP299v e *Lactobacillus rhamnosus* GG, às condições gastrointestinais simuladas in vitro em suco de manga tropical. As cepas de *L. rhamnosus* GG (7,96 log UFC/mL⁻¹) e *L. plantarum* LP299v (7,74 log UFC/mL⁻¹)

demonstraram viabilidade superior durante os 28 dias de armazenamento. Já a cepa *L. acidophilus* La-5 ($3,81 \log \text{ UFC/mL}^{-1}$) apresentou redução na viabilidade, após 21 dias de armazenamento. O teste de resistência do trato gastrointestinal *in vitro* mostrou que $6,76 \log \text{ UFC/mL}^{-1}$ de *L. rhamnosus* GG e $6,09 \log \text{ UFC/mL}^{-1}$ de *L. plantarum* LP299V chegaram ao estágio entérico. Os autores concluíram que, o suco de manga tropical não foi uma boa matriz para transportar *L. acidophilus* La-05, entretanto, foi uma boa matriz carreadora para *L. rhamnosus* GG e *L. plantarum* LP 299v, sendo bem aceito e, portanto, uma alternativa para populações com restrições alimentares.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental quantitativo. Os experimentos foram realizados com as bactérias *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7. O estudo foi subdividido nas seguintes etapas: (1) determinação da farinha que foi utilizada e sua respectiva quantidade. (2) elaboração do leite desnatado reconstituído a 10%, enriquecido ou não com 4,5% de farinha de grão-de-bico e fermentado separadamente com as bactérias lácticas *L. plantarum* S180.7 ou SBR 64.7. (3) determinação da cinética de crescimento das bactérias *L. plantarum* S180.7 e SBR 64.7 no leite enriquecido ou não, com 4,5% de farinha de grão-de-bico. (4) análise da composição centesimal do leite fermentado enriquecido ou não, com 4,5% de farinha de grão-de-bico. (5) estabilidade físico-química e microbiológica do leite fermentado enriquecido ou não, com 4,5% de farinha de grão-de-bico durante o período de estocagem (6) determinação da sobrevivência das estirpes *L. plantarum* S180.7 e SBR 64.7 no leite fermentado enriquecido ou não, com 4,5% de farinha de grão-de-bico após exposição á condições de estresse gastrointestinal *in vitro*. (7) análise de fenólicos totais e potencial antioxidante do leite fermentado enriquecido ou não, com 4,5% de farinha de grão-de-bico. (8) análise estatística dos resultados.

4.2 Preparo da cultura estoque

As culturas utilizadas foram *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7. Ambas pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Higiene dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Inicialmente, foi retirado 100 μL das culturas que estavam estocadas no ultrafreezer a -80°C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) e em seguida foram adicionadas em tubo de vidro

contendo 5 mL de caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Acumedia-Neogen, Michigan, EUA). Após o respectivo tubo foi incubado em uma estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, foi confirmada a pureza das culturas. Para isso, foi realizada uma estria para cada cultura, em placa de Petri contendo ágar MRS. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após, foram realizados dois cortes com a alça de repicagem nas placas de Petri, afim de selecionar colônias isoladas. As colônias selecionadas foram adicionadas em tubos de vidro contendo 5 mL de caldo MRS, e incubados em estufa por 24 horas a 37°C. Uma alíquota de 600 µL das culturas ativas (inóculo de 2%) foi adicionada em tubos Falcon contendo 30 mL de caldo MRS, e os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após incubação os tubos contendo as culturas foram centrifugados a 5.000 rpm; 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 5 mL de salina 0,85%, essa etapa foi realizada duas vezes. As culturas foram ressuspendidas em 4 mL de caldo MRS 20% glicerol e homogeneizadas em aparelho vórtex. Quatro alíquotas de 1 mL de cada cultura foram armazenadas imediatamente a -80° C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos). Todos experimentos foram feitos a partir do estoque dessas culturas.

4.2.1 Ativação dos micro-organismos e padronização das culturas *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7

Alíquotas de 100 µL de cada uma das culturas estoque *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7, foram adicionadas em tubos de vidro contendo 5 mL de caldo MRS, e incubadas em uma estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Em seguida, as culturas foram semeadas pela técnica de estriamento em placa de Petri, contendo o meio seletivo ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Posteriormente, foram feitos dois cortes em cada placa de Petri contendo a cultura e, após isso, foram adicionados em tubos de vidro contendo 5 mL de caldo MRS, que foram imediatamente incubados a 37°C por 24 horas. 200 µL (inóculo de 2%) de cada cultura foram distribuídos em tubos Falcon contendo 10 mL de caldo MRS, e incubados a 37°C por 48 horas, e centrifugados a 5.000 rpm, 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados em 5 mL de solução salina 0,85%.

O procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido duas vezes e as culturas ressuspendidas em 10 mL de salina 0,85% e homogeneizadas. A padronização das culturas foi feita para 10^8 UFC, utilizando-se a escala 2 (6×10^8) de Mac Farlend. Para padronizar as culturas, foram adicionados 10 mL de solução salina 0,85% em dois tubos de vidro estéreis, sendo um tubo para cada cultura. Utilizando a escala 2 de Mac Farlend como padrão, foi colocado gota por gota de cada cultura no seu respectivo tubo com 10 mL de solução salina 0,85% até que a turbidez estivesse idêntica à da escala de Mac Farlend. Posteriormente, ambas as culturas foram inoculadas ao leite.

4.3 Elaboração das formulações a base de leite desnatado reconstituído enriquecido ou não com 4,5% de farinha de grão-de-bico

As formulações foram elaboradas a base de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% adicionado de *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR 64.7, e enriquecido ou não com 4,5% de farinha de grão-de-bico.

1. Formulação Controle 1 (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL;
2. Formulação Teste 1 (FT1): LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC /mL + farinha de grão-de-bico (4,5%);
3. Formulação Controle 2 (FC2): leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR 64.7 8 log UFC /mL;
4. Formulação Teste 2 (FT2): LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR 64.7 8 log UFC /mL + farinha de grão-de-bico (4,5%).

No preparo das formulações FC1 e FC2 foi utilizado 100g de açúcar cristal + 100g de LDR 10%, reconstituído em 1000 mL de água destilada. As formulações foram processadas no liquidificador (Walita modelo RI7630/22) em potência 1 por 30 segundos. Em seguida, foram preparadas as formulações FT1 e FT2, contendo 95,5g desse LDR 10% + 4,5g de farinha de grão-de-bico. As formulações foram processadas, conforme descrito anteriormente. Após foram distribuídas em garrafas de vidro, previamente identificadas e autoclavadas a 121°C por 20 minutos. Após, as garrafas de vidro contendo as formulações foram armazenadas sob refrigeração a 4°C por 16 horas, para posterior inoculação das culturas.

4.4 Determinação da cinética de crescimento dos micro-organismos *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas diferentes formulações

Os parâmetros cinéticos de crescimento avaliados foram: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e viabilidade microbiana. Imediatamente após a inoculação de 1% de cada cultura nas respectivas formulações, foram retiradas alíquotas correspondentes ao tempo 0 horas de fermentação. Em seguida, as formulações foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C e foram retiradas alíquotas correspondentes aos tempos 3, 6, 9, 12 e 24 horas de fermentação.

4.4.1 pH

A análise de pH foi realizada utilizando pHmetro de bancada digital (modelo PHS – 3E) que foi devidamente calibrado com as soluções tampão de pH 4 e pH 6. Em béqueres de vidro previamente identificados foram pesadas alíquotas de 10 g de cada uma das formulações, o bulbo do pHmetro foi inserido diretamente nas amostras e após a estabilização do aparelho, foram obtidos os valores de pH.

4.4.2 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL,2008). Alíquotas de 10 g de cada uma das formulações foram homogeneizadas e adicionadas a 100 mL de água destilada. A titulação realizada com solução de NaOH 0,1 M utilizando fenolftaleína como indicador de viragem. A acidez titulável total foi expressa em g/100 g de ácido láctico e determinada a partir da seguinte equação:

$$\text{Acidez Titulável} = \frac{V \times F \times M \times PM}{10 \times P \times n}$$

Em que:

V = volume de solução NaOH gasto na titulação (mL);

F = fator da correção da solução de NaOH

M = molaridade da solução;

PM = peso molecular do ácido láctico;

P = massa da amostra (g);

n = número de hidrogênios ionizáveis;

4.4.3 Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis totais foram determinados utilizando refratômetro digital (Atago modelo 1T), de acordo com o método 932.12 (AOAC 2005). Alíquotas de cada amostra foram retiradas com pipetas Pasteur e depositadas no refratômetro, os resultados foram expressos em °Brix.

4.4.4 Viabilidade

A viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7 nas formulações foi determinada a partir da técnica *Drop plate* (plaqueamento por microgotas), utilizando o meio de cultura MRS ágar. O volume da microgota depositada na placa foi de 20 µL. As amostras foram diluídas de forma seriada em solução salina 0,85%, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , em seguida plaqueadas em MRS ágar e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Posteriormente, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nas diluições que apresentaram entre 20 e 80 colônias. Os resultados foram expressos em log UFC/mL de colônias. O cálculo de contagem de bactérias foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{Viabilidade} = \text{UFC} * \text{Diluição} / V_m$$

Em que:

UFC: Número de colônias (entre 20 e 80);

Diluição: A diluição que foi feita a contagem;

Volume microgota: volume da microgota depositada na placa (mL).

4.5 Determinação da composição química centesimal das formulações

Ao LDR 10% foi adicionado ou não, 4,5% da farinha de grão-de-bico. Após ser autoclavado, foi inoculado 1% de cada uma das culturas de acordo com as formulações. As garrafas de vidro foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, para que acontecesse o processo de fermentação. Após isso, as amostras foram congeladas a -20°C até a realização do respectivo experimento.

4.5.1 Umidade

A umidade foi determinada de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Cadinhos vazios foram pesados individualmente e identificados. Em seguida, nos cadinhos foram pesadas 5g de cada formulação e os mesmos foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas, até obtenção de peso constante. Após esse período, as amostras foram para o dessecador por 30 minutos para chegarem a temperatura ambiente e serem pesadas. A umidade foi expressa em porcentagem de base úmida, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Matéria seca (\%)} = \frac{P3 - P1}{P2} * 100$$

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \% \text{ matéria seca}$$

Em que:

P1 = peso cadinho seco (g).

P2 = peso inicial da amostra (g).

P3 = peso final amostra (com cadinho) (g).

4.5.2 Proteína

O teor de proteína total foi determinado utilizando o método de *Kjeldahl* 991.22 (AOAC, 2005). Aproximadamente 2 g de cada formulação foram adicionadas em tubos digestores, contendo 1 g de mistura catalítica. Em seguida, foram adicionados 4 mL de H₂SO₄ e os tubos foram levados para bloco digestor a 450°C por aproximadamente 4 horas e 30 minutos. Após as amostras atingirem temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de água destilada aos tubos para destilação do nitrogênio em destilador Tecnal (modelo TE – 036/1). Para cada amostra, aproximadamente 7,5 mL de H₃BO₃ (ácido bórico) foram adicionados em béqueres de vidro, com mais 4 gotas de azul de metileno + vermelho de metila, usado como indicador de viragem. O béquer de vidro com ácido bórico foi acoplado ao no destilador e 10,5 mL de NaOH 50% foram adicionados no copo medidor do aparelho e, em seguida, foi iniciado o processo de destilação. A etapa de titulação foi realizada com HCl 0,1 M até que as amostras atingirem o ponto de viragem. A concentração de nitrogênio foi expressa em porcentagem utilizando a seguinte equação:

$$\% N = V \times M \times f \times 14 \times 100 / P$$

Em que:

V = volume gasto da solução de HCl na titulação (mL).

M = molaridade da solução de HCl.

f = fator de correção da solução de HCl.

P = peso da amostra (mg).

A quantidade de proteína presente nas formulações foi determinada a partir da multiplicação do resultado do teor de nitrogênio (% N), pelo fator de conversão de nitrogênio para amostras de leite (6,38), conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ Proteína} = \% N \times 6,38.$$

4.5.3 Lipídio

O teor lipídico total das formulações foi determinado a partir método de extração Am 5-04, utilizando o extrator de lipídios (modelo ANKOM XT15 da Ankom Technology, New York, United States of America) (AOCS, 2005). As amostras foram colocadas em estufa a 60°C por 72 horas, para evaporação parcial da água e concentração da matriz, em seguida foi pesado aproximadamente 1,5 g de cada amostra em sachês de lipídios, que foram identificados com grafite e selados. Os sachês permaneceram na estufa a 105°C por 2 horas e posteriormente foram para o dessecador por 30 minutos. Após, as amostras foram colocadas em cartuchos do extrator. Foram utilizados 300 mL de éter de petróleo como solvente para a extração de lipídeos, que durou cerca de 1 hora. Logo após, as amostras foram inseridas em estufa a 105°C por 1 hora, para evaporação do solvente, em seguida foram colocadas em dissecador por 30 minutos e pesadas.

A concentração de lipídio foi determinada pela diferença de massa antes e após a extração, utilizou-se a massa das amostras em base úmida, portanto o teor de lipídio foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídio} = (100 \times \text{gramas de lipídeos extraídos}) / \text{gramas de amostra em base úmida.}$$

4.5.4 Resíduo mineral (cinzas)

A análise de resíduo mineral (cinzas) foi realizada pelo método 945.45 (AOAC, 2005). Após serem pesadas, as amostras descritas no item “4.6.1” foram colocadas em mufla a 600°C por 4 horas, e em seguida levadas ao dessecador por 30 minutos e depois pesadas. A determinação do percentual de cinzas foi obtida pela equação:

$$\% \text{ Resíduo mineral} = P3 - P1 * 100 / P2$$

Em que:

P1 = peso cadinho (g).

P2 = peso inicial da amostra (g).

P3 = peso da matéria mineral (g).

4.5.5 Fibra Bruta

A quantificação de fibra bruta das formulações foi determinada pela metodologia 978.10 da AOAC (2005) com algumas modificações. Inicialmente as amostras foram colocadas em estufa a 60°C por 72 horas, para evaporação parcial da água e concentração da matriz. 1,5 g de cada amostra foram pesadas em sachês previamente identificados e selados, e colocadas em estufa a 105°C por 2 horas. Após permanecerem por 30 minutos no dessecador, foi iniciado o processo de extração das fibras. Os sachês foram organizados em um *Erlenmeyer* 1000 mL de uma solução ácida de H₂SO₄ 1,25 %, feita a partir de 16 mL de H₂SO₄ + 1000 mL de água destilada. O *Erlenmeyer* com os sachês e a solução ácida foram autoclavados a 121 °C por 24 minutos. Em seguida, a solução ácida foi descartada, e então adicionou-se ao *Erlenmeyer* com os sachês 1000 mL de água destilada e autoclavou-os novamente sob as mesmas condições.

Após serem autoclavados com água destilada, essa água foi descartada e o *Erlenmeyer* foi preenchido com 1000 mL da solução básica de NaOH 1,25 %, preparada a partir de 25 mL de NaOH e 1000 mL de água destilada. Logo após, o *Erlenmeyer* foi novamente autoclavado sob as mesmas condições, a solução básica foi descartada e adicionou-se 1000 mL de água destilada e autoclavou-os novamente sob as mesmas condições. Posteriormente, os sachês foram colocados em estufa a 105°C durante 2 horas, em seguida ficaram no dessecador por 30 minutos e então pesados novamente.

O cálculo utilizado para obtenção de fibra bruta foi o seguinte:

$$\% \text{ Fibras} = (\text{Pdg} - \text{Ps}) / (\text{m1} \times 100)$$

Em que:

Pdg = Peso da amostra após digestão e estufa (com sachê) (g).

Ps = Peso do sachê vazio (g).

m1 = massa da amostra inicial (g).

4.5.6 Carboidrato

O teor de carboidratos totais presentes nas amostras foi determinado por diferença, com base no método 986.25 (AOAC, 2005) através da seguinte equação:

$$\% \text{CHO} = 100 - \% \text{Umidade} - \% \text{Proteína} - \% \text{Lipídio} - \% \text{Cinzas}.$$

4.6 Caracterização físico-química e microbiológica das formulações durante armazenamento refrigerado a 4°C

Os parâmetros tecnológicos e a viabilidade do micro-organismo nas formulações (FC1, FT1, FC2 e FT2) foram analisados durante o período de 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4°C. Os seguintes parâmetros: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, viabilidade e quantificação de bolores e leveduras foram avaliados nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4°C. Já os parâmetros de estabilidade durante armazenamento e capacidade de retenção de água foram avaliados no dia 0 e 28.

Os parâmetros tecnológicos pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais foram determinados conforme descrito nos itens “4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3” respectivamente.

4.6.1 Estabilidade física

Para a análise de estabilidade física durante armazenamento, foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada formulação, adicionadas a tubos de vidro de 10 mL e armazenadas a 4°C por 0 e 28 dias. Nos dias 0 e 28 de armazenamento foi determinada a separação de fases

(sobrenadante e pellet), através da determinação da altura do sobrenadante com uma régua, os valores foram obtidos em mm, e foi feita uma regra de 3 para transformar os valores em mL (ZAABOUL et al., 2019).

4.6.2 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água foi determinada a partir do método de Guzman-Gonzalez et al., (1999), com modificações. Foram retiradas alíquotas de 25 mL de cada tratamento, colocadas em tubos Falcon de 50 mL e o peso foi registrado. Os tubos foram centrifugados a 500xg por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e pesado separadamente, seu peso foi registrado. Os resultados foram expressos em porcentagem, obtido a partir da seguinte equação:

Em que:

$$WHC = \left(1 - \frac{m_s}{m_y} \right) \cdot 100\%$$

WHC = capacidade de retenção de água da amostra;

ms = massa (g) sobrenadante após a centrifugação;

my = massa (g) da formulação pesada inicialmente.

4.6.3 Viabilidade

A viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas formulações (FC1, FT1, FC2 e FT2) durante o período de estocagem foi avaliado de acordo com o procedimento descrito no item “4.4.4”.

4.7 Sobrevivência de *L. plantarum* S180.7 e SBR 64.7 após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal

A viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 foi determinada: (i) antes da exposição ao suco gástrico e pancreático, (ii) após exposição ao suco

gástrico, (iii) após exposição ao suco pancreático e (iv) após exposição ao suco gástrico e pancreático em condições sucessivas.

(i) Viabilidade do leite fermentado antes da exposição ao suco gástrico e pancreático

Alíquotas de 100 μ L de cada uma das formulações foram transferidas para microtubos de capacidade de 1,5 mL, contendo 900 μ L de salina 0,85% e foram então diluídas de forma seriada de 10^{-1} até 10^{-6} . A técnica *Drop Plate* (plaqueamento por microgotas) foi aplicada e placas de Petri contendo meio de cultura ágar MRS foram utilizadas para plaqueamento. Após isso, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. A contagem de UFC foi determinada após o período de incubação e expressa em log UFC/mL de colônias.

(ii) Digestão gástrica simulada

O suco gástrico sintético foi produzido conforme protocolo de Bautista-Gallego et al. (2013), com modificações. O tampão foi preparado com NaCl (0,205 g/L), K_2HPO_4 (0,060 g/L), $CaCl_2$ (0,011 g/L), KCl (0,037 g/L) e 100 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1M e o tampão foi autoclavado a 121° C por 21 minutos. No dia da realização do experimento, foram homogeneizados 5.640 mL de tampão gástrico com 360 μ L da enzima pepsina (0,6 %) (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil). Alíquotas de 200 μ L de cada uma das formulações foram transferidas para microtubos de capacidade de 1,5 mL, e logo após, adicionou-se 200 μ L de suco gástrico. Os microtubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37° C por 90 min (CALABUIG-JIMÉNEZ et al., 2019).

Após as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm a 4° C por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 400 μ L solução salina 0,85%, e homogeneizado em vórtex. Novamente, as amostras foram centrifugadas e depois lavadas, sob as mesmas condições. As amostras foram ressuspensas em 400 μ L de solução salina 0,85% e foram diluídas de forma seriada de 10^{-1} até 10^{-6} . O plaqueamento foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar MRS e utilizou-se a técnica *Drop Plate* (plaqueamento por microgotas). Após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. A contagem de UFC foi determinada após o período de incubação e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

(iii) Digestão pancreática simulada

O suco pancreático foi produzido conforme protocolo de Bautista-Gallego et al. (2013), com modificações. O tampão pancreático foi preparado com fosfato de sódio bibásico

heptahidratado (5,081 g/L), NaCl (0,85 g/L), sais biliares (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich®) e 100 mL água destilada. O pH do tampão pancreático foi ajustado para 8,0 com solução de HCl 1M. Posteriormente, o tampão foi autoclavado a 121° C por 21 minutos.

No dia da realização do experimento, foram misturados 5.940 mL de tampão pancreático com 60 µL da enzima pancreatina (0,1 %) (marca Sigma-Aldrich®). Alíquotas de 200 µL das formulações foram transferidas para microtubos de capacidade de 1,5 mL, após, adicionou-se 200 µL de suco pancreático. Os microtubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37° C por 90 min (CALABUIG-JIMÉNEZ et al., 2019). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm a 4°C por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 400 µL solução salina 0,85%, e homogeneizado em vórtex. Novamente, as amostras foram centrifugadas e depois lavadas, sob as mesmas condições mencionadas anteriormente.

As amostras foram ressuspensas em 400 µL de solução salina 0,85% e diluídas de forma seriada de 10⁻¹ até 10⁻⁶. O plaqueamento foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar MRS e utilizou-se a técnica *Drop Plate* (plaqueamento por microgotas). Após, as placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas. A contagem de UFC foi determinada após o período de incubação e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

(iv) Exposição sucessiva aos sucos gástrico e pancreático

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita nos itens (ii) e (iii). Porém, após a exposição ao suco gástrico por 90 min, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de suco pancreático. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 90 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas e lavadas com solução salina 0,85% conforme o item (iii). O plaqueamento foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar MRS e utilizou-se a técnica *Drop Plate* (plaqueamento por microgotas) (CALABUIG-JIMÉNEZ et al., 2019). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

4.7.1 Determinação da porcentagem de sobrevivência das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7

A partir da obtenção dos valores de log UFC/mL, antes e após exposição as condições gastrointestinais *in vitro* das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7 nas formulações, foi determinada a porcentagem de sobrevivência das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7, por meio da seguinte equação:

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \log N1 / \log N0 \times 100$$

Em que:

N1 = contagem (log UFC/mL) após a exposição as condições de estresse gastrointestinal *in vitro*.

N0 = contagem (log UFC/mL) antes da exposição as condições de estresse gastrointestinal *in vitro*.

4.8 Concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações

As análises de fenólicos totais e atividade antioxidante foram realizadas com as alíquotas das formulações, coletadas durante o experimento de cinética de crescimento (0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) e de armazenamento (0 e 28 dias).

4.8.1 Preparo das amostras

As amostras foram clarificadas a partir da metodologia descritas por Carrez., (1909) e Acker et al., (1967) com modificações. Os reagentes utilizados para a clarificação das amostras foram Carrez I - Ferrocianeto de Potássio thihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$) e Carrez II – Sulfato de Zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \times 7H_2O$). Para preparar a solução Carrez I foi necessário pesar 15g de $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ e completar o volume para 100 mL com água Mili-Q. Já para preparar a solução de Carrez II, foi preciso pesar 30g de $ZnSO_4 \times 7H_2O$ e completar o volume para 100 mL com água Mili-Q. Para realizar a clarificação, foi preciso alíquotar 500 μ L de cada uma das formulações e adicioná-las em microtubos previamente identificados. Logo após, adicionou-se 10 μ L da solução Carrez I e homogeneizou-se por 60 segundos no vórtex. O mesmo processo foi repetido com a solução Carrez II. Após serem homogeneizados, o volume dos microtubos com as amostras foi completado para 1 mL, com 480 μ L de água Mili-Q e homogeneizados no vórtex por 60 segundos. Logo após, os tubos com as amostras foram centrifugados a 7.800xg por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi

reservado para dar-se prosseguimento aos experimentos quantitativos e o pellet foi descartado. As amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) para posterior determinação do potencial antioxidante.

4.8.2 Fenólicos Totais

A análise de fenólicos totais foi determinada a partir do protocolo estabelecido por Singleton e Rossi., (1965). Inicialmente, foi realizada uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0, 30, 100, 150, 200, 500, 750 e 1.000 $\mu\text{mol/L}$ para servir de parâmetro para as amostras. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 20 μL das amostras clarificadas, 100 μL da solução de Folin-Ciocalteu (1/10) e 80 μL de solução de Na_2CO_3 7,5%.

Como branco específico, foi considerado (20 μL das amostras clarificadas + 100 μL de água Mili-Q + 80 μL de Na_2CO_3 7,5%), branco total da água (20 μL de água Mili-Q + 100 μL da solução de Folin-Ciocalteu (1/10) + 80 μL de Na_2CO_3 7,5%), branco total Carrez (20 μL de solução Carrez + 100 μL da solução de Folin-Ciocalteu (1/10) + 80 μL de Na_2CO_3 7,5%) e controle ácido gálico (20 μL ácido gálico + 100 μL da solução de Folin-Ciocalteu (1/10) + 80 μL de Na_2CO_3 7,5%)

A solução Carrez foi feita de acordo com o item “4.9.1”, porém não foi utilizada amostra, somente solução Carrez I, II e água Mili-Q. Para realizar o controle ácido gálico, foi utilizado o ponto 150 $\mu\text{mol/L}$ da curva padrão. A microplaca com as amostras foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora, sob proteção de luz. A leitura da absorbância foi determinada a 765 nm no espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi- Mode Microplate Readers, San Jose, California). A concentração de fenólicos totais do leite fermentado foi expressa μmol ácido gálico/L leite fermentado.

4.8.3 Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP)

O potencial antioxidante redutor do Fe foi determinado a partir da metodologia descrita por Benzie e Strain., (1996). Uma curva padrão de hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX, Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500, 1.000 e 1.500 $\mu\text{mol/L}$ foi construída para ser comparada com as amostras. O reagente FRAP foi preparado a partir de: 15 mL de Tampão Acetato 0,3 mol/L

(pH 3,6) + 1,5 mL de solução de 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine 10 mmol/L (TPTZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em HCl 40 mmol/L + 1,5 mL de solução cloreto férrico FeCl₃ 20 mmol/L (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). O FRAP foi armazenado em frasco âmbar e aquecido a 37°C por 30 minutos.

O experimento foi realizado em microplacas que continham 4 µL de água Mili-Q, 20 µL de amostra e 180 µL do reagente FRAP, e a leitura da absorbância foi feita a 593 nm a cada 30 segundos, por 10 min em espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California). Considerou-se como branco específico (20 µL de amostra + 184 µL de água Mili-Q) e controle TROLOX (4 µL de água Mili-Q + 20 µL de TROLOX + 180 µL do reagente FRAP). Para realizar o controle TROLOX, foi utilizado o ponto 200 µmol/L da curva padrão. Os resultados do potencial antioxidante das amostras foram expressos em µmol TROLOX / L leite fermentado.

4.8.4 Capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

A capacidade de eliminação de radicais livres foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Cheng et al., (2006). As amostras foram analisadas em cinco concentrações diferentes (5, 10, 20, 30 e 40 µL), sendo que o volume final foi de 100 µL, para isso foi completado com água Mili-Q (95, 90, 80, 70 e 60 µL). Após serem postas nas placas as quantidades de amostra e água Mili-Q citadas anteriormente, foi acrescentado 100 µL do reagente DPPH• 0,208 mmol/L. Na mesma placa, foi feito branco específico, onde o reagente DPPH• 0,208 mmol/L foi substituído por 100 µL de etanol absoluto. Também foi feito controle positivo (100 µL etanol absoluto + 100 µL do reagente DPPH• 0,208 mmol/L) e branco total (200 µL de etanol absoluto). A absorbância foi determinada a 515 nm a cada 30 segundos por 30 minutos.

Uma curva padrão de hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) com as concentrações de 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µmol/L foi realizada e o potencial antioxidante das amostras foi calculado mediante a fórmula descrita abaixo:

$$DRSC = \frac{AUC \text{ Sample}}{AUC \text{ TROLOX}} \times \frac{[Sample \mu L]}{[TROLOX \mu L]}$$

Onde:

DSRC = capacidade relativa de eliminação do radical DPPH•

AUC = área abaixo da curva, que é calculada a partir das variáveis “tempo de reação” x % DPPH• “eliminado”.

4.9 Análise estatística dos resultados

O trabalho foi realizado a partir do Delineamento Inteiramente Casualizado em Esquema Fatorial 4 x 6 x 5, sendo 4 formulações (FC1, FT1, FC2 e FT2), 6 tempos em horas (0, 3, 6, 9, 12 e 24) e 5 tempos em dias (0, 7, 14, 21 e 28). O desenho experimental do estudo é formado por quatro formulações a base de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% adicionado de *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR 64.7, e enriquecido ou não com 4,5 % de farinha de grão-de-bico. Sendo seis medidas (horas) em diferentes de intervalos de tempo para cinética de crescimento e cinco medidas (dias) diferentes de intervalos de tempo de armazenamento (exceto para análise de composição centesimal e sobrevivência em condições gastrointestinais *in vitro*).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e o teste Scott-Knott foram utilizados para calcular diferenças significativas em $P < 0,05$. Os dados analisados nos intervalos de tempo de fermentação e cinética de crescimento foram submetidos à análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR (versão 5.6). O software SigmaPlot versão 14.0 foi utilizado para obtenção das equações e construção dos gráficos.

REFERENCIAS

A.MIZOCK, B. et al. Probiotics. *Disease-a-Month*. p. 259-290, 2015.

ABDEL-HAMID, M. et al. Bioactive properties of probiotic set-yogurt supplemented with *Siraitia grosvenorii* fruit extract. **Food Chemistry**. 303, 2020.

ABERRA, B; LEMMA, D AND ITICHA I. Study of bovine mastitis in assella government dairy farm of Oromia Regional state, South Eastern Ethiopia international journal of current research and academic review. **Int J Curr Res Aca** 1(2): 134-145. 2013.

ACKER, L., BERGNER, K.-G., DIEMAIR, W., HEIMANN, W., KIERMEIER, F., SCHORMÜLLER, J., SOUCI, S. W.: *Handbuch der Lebensmittelchemie, Band II/2, Analytik der Lebensmittel, Nachweis und Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen*, S. 331, **Springer Verlag** (1967).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 76, DE 5 DE NOVEMBRO DE 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Dispões sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa de obrigatoriedade de registro de

produtos pertinentes à área de alimentos. Resolução n. 22, de 15 de março de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 mar. 2000.

AKBABA, U.; ŞAHIN, Y.; TÜRKEZ, H. The element contents in chickpeas grown under organic and conventional farming regimes using WDXRF analysis for human nutrition and health. **Turkish Journal of Physics**, v. 36, n. 2, p. 279–287, 2012.

AL-HINDI, R. R; GHANI, S. A. E. Production of Functional Fermented Milk Beverages Supplemented with Pomegranate Peel Extract and Probiotic Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Quality**. 2020.

ALMEIDA, M. H. B. et al. Potentially probiotic açai yogurt. **Society of Dairy Technology**. v. 61, n. 2, p. 178-182, 2008.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. AOCS. Approved procedure am 5-04 rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. 2005.

ARAÚJO, E. A. et al. Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. **Journal of Functional Foods**. v.2, p. 85-89, 2010.

AYIVI, R. D. et al. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. **Dairy**. p. 202-232, 2020.

BACCHI, M. D; ALMEIDA, A. N; TELLES, T. S. Spatio-temporal dynamics of milk production in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 43, n. 1, p 241-262, 2022.

BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, n.1, p. 135–142, 2013.

BEHERA, Sudhanshu. S; RAY, Ramesh. C; ZDOLEC, Nevijo. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. **BioMed Research International**, 2018.

BELL, V; FERRÃO, J; FERNANDES, T. Nutritional Guidelines and Fermented Food Frameworks. **Foods**. v. 6, s.p., 2017.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIXQUERT, J. M. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v.101, p.553-564, 2009.

BURNS, P. et al. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* to bile. **International Journal of Food Microbiology**. v. 142, p. 132-41, 2010.

CALABUIG-JIMENEZ, L., BETORET, E., BETORET, N., PATRIGNANI, F., BARRERA, C., SEGUÍ, L., ... DALLA ROSA, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius spp. salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion. **Journal of Food Engineering**, 240, 43–48.

CARRA, S. H. Z. et al. Water productivity of milk produced in three different dairy production systems in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**. 2022.

CARREZ, M.C.: Annales de chimie analytique 14,187–189 (1909).

CASAROTTI, S. N; PENNA, A. L. B. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1- 6, 2015.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429–7436, 2006.

COSTA, M. P. et al. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Centro Científico Conhecer**. v. 9, n. 16, p. 1387-1408, 2013.

COSTA, R. J. et al. Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. **Journal of Food Quality**. 2019.

DINIZ-SILVA, H. T. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese made with oregano and rosemary essential oils. **Food Microbiology**, p. 103348, 2019.

EL-SOUD. et al. *Bifidobacterium lactis* in the treatment of children with acute diarrhea. A double-blind randomized controlled trial. **Maced. J. Med. Sci.** p. 403-407, 2015.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland. 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002.

FOROUTAN, A. et al. Chemical composition of commercial cow's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 67, p. 4897-4914, 2019.

FRIZZO, A. F; ANDRIGHI, D; STARIKOFF, K. R. Microbiological and physicochemical characterization of refrigerated raw milk during storage in the farm. **Medicina Veterinária (UFRPE)**. v. 13, n. 2, p. 293-300, 2019.

FU, Y. H.; ZHANG, F. C. Changes in isoflavone glycoside and aglycone contents of chickpea yogurt during fermentation by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 744–750, 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*, v. 66, p. 365–378, 1989.

FURTADO, L. L. et al. Viability of probiotic bacteria in tropical mango juice and the resistance of the strains to gastrointestinal conditions simulated *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 149–162, 2019.

GIRAFÁ, G; CHANISHVILI, N; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Institut Pasteur**. v. 161, p. 480-487, 2010.

GUPTA, V; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**. Índia, v. 27, n. 3, p. 202-209, 2009.

GUZMAN-GONZALEZ, M., MORAIS, F., RAMOS, M., & AMIGO, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat settype yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79(8), 1117 e 1122.

HAMEED, A. M. et al. Amino Acids, Solubility, Bulk Density and Water Holding Capacity of Novel Freeze-Dried Cow's Skimmed Milk Fermented with Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* Bu-Eg5 and *Lactobacillus rhamnosus* Bu-Eg6. **Arabian Journal of Chemistry**, 2021.

HAN, S. et al. Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 11, 2021.

HANG, F. et al. Preliminary study for the stimulation effect of plant-based meals on pure culture *Lactobacillus plantarum* growth and acidification in milk fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, 2020.

HENRIQUE, J. C; OLIVEIRA, L. D. M; NUNES, E. L. Análise da cadeia agroindustrial do leite. **Revista Brasileira de Pesquisas Agrícolas**, v. 01, n. 02, 2020.

HILACHUK, D; PAULA, D. Monitoramento Tecnológico de Probióticos para Alimentação Humana. **Cadernos de Prospecção**. v. 15, n. 2, p. 362-378, 2022.

HUSSAIN, M. I. et al. Botany, Nutritional Value, Phytochemical Composition and Biological Activities of Quinoa. **Plants**, v. 10, 2021.

HUSSEIN, H. et al. Impact of chickpea as prebiotic, antioxidant and thickener agent of stirred bio-yoghurt. **Annals of Agricultural Sciences**, 2020.

HUTH, P. J; DIRIENZO, D. B; MILLER, G. D. Major Scientific Advances with Dairy Foods in Nutrition and Health. **Journal of Dairy Science** 89(4): 1207-1221. 2006.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

INÊS, A. et al. REVIEW: WINE LACTIC ACID BACTERIA - Part I. **Ciência Téc. Vitiv.** v. 23, n. 2, p. 81-96, 2008.

JAVAID, S. B; GADAH, J. A; KHASKELI, M; BHUTTO, M. B; KUMBHER, S. et al. Physical and Chemical Quality of Market Milk Sold at Tandojam, Pakistan. **Pakistan Vet J** 29(1): 27-31. 2009.

KHORSHIDIANA, Nasim; YOUSEFIA, Mojtaba; MORTAZAVIANB, A, M. Fermented milk: The most popular probiotic food carrier. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 94, p. 91-114, 2020.

KÖNIG, H.; FROHLICH, J.; UNDEN, G. Lactic Acid Bacteria. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. **Springer Nature**, 2017.

LEANDRO, E. S. et al. Isolation, Identification and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Forage Species Plants, cocoa beans and artisan salami. **Probiotics and Antimicrobial. protection**, v. 13, p. 173-186, 2021.

LI, C. et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during post fermentation storage. **American Dairy Science Association**, p. 2512-2525, 2017.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIU, Yen-Wenn; LIONG, Min- Tze; TSAI, Ying-Chieh. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 601–613, 2018.

LUNARDI, A. et al. Non Starter Lactic acid bacteria (NSLAB): A challenge to the cheese industry. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021.

MA, C. et al. Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. **LWT - Food Science and Technology**, p. 884-889, 2016.

MARGIER, M. et al. Nutritional composition and bioactive content of legumes: Characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2018.

MENEZES, M. F. C. et al. Microbiota and conservation of milk. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - **REGET**. v. 18, p. 76-89, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITES FERMENTADOS. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. Regulamento Técnico 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. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002.

MORAES, M. L. et al. Physicochemical characterization of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* added with hibiscus extract during storage. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 1, p. 1-11, 2022.

MORA-VILLALOBOS, J. A. et al. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. **Fermentation**. v. 6, n. 23, 2020.

MORELLI, L.; Capurso, L. Diretrizes da FAO/OMS sobre Probióticos. **J. Clin. Gastroenterol**, v. 46, 2012.

MOTTA, A. S; GOMES, M. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Rev. Inst. Laticínios**. v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.

NATH, S. et al. In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. **Food Quality and Safety**, v. 4, p. 213–223, 2020.

NAZZARO, F. et al. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 280–285, 2012.

OLATUNJI, E. A; JUBRIL, A. E; OKPU, E. O; OLAFADEHAN, O. A; IJAH, U. J. et al. Bacterial Assessment and Quality Analysis of Raw Milk Sold in Gwagwalada Area Council of the Federal Capital Territory (FCT) Abuja, Nigeria. **Food Science and Quality Management** 7: 1-4. 2012.

Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde FAO/OMS. Propriedades nutricionais e de saúde de probióticos em alimentos, incluindo leite em pó com bactérias vivas de ácido láctico. 2001.

ORLA-JENSEN, S. As bactérias do ácido láctico; Anfitrião: Copenhague, 1919.

PACHECO, K. C. et al. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* Under Human Gastrointestinal Conditions Simulated In Vitro. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**. v. 1, p. 37-42, 2010.

PARKER R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PEDERSON, CS Gênero I. *Lactobacillus Bejerinck*, 1901, no Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey.

PELLEGRINI, L. G. et al. Physico-chemical characteristics of bovine, caprine and ovine milk. **Synergismus scyentifica**. 2012.

PEREIRA, A. A. R; LUSNE, A. P. I. Probióticos e pré-biotios na prevenção e tratamentos de doenças. **Revista Brasileira Multidisciplinar: ReBraM**, v. 22, n. 3, p. 162-176, 2019.

PEREIRA, M. T; SANTANA, E. H. W; SANTOS, J. S. Importance of Lactic Acid and Non Starter Bacteria (NSLAB) in Dairy Derivatives Production Technology. **Ensaíos**. v. 24, n. 4, p. 348-352, 2020.

PIGNATA, M. C. et al. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**. v. 27, n. 4, p. 226-233, 2014.

RACHWA-ROSIK, D.; NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Chickpeas. Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 55, n. 8, p. 1135–1143, 2015.

RUIZ, L; MARGOLLES, A; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Frontiers in Microbiology**. v. 4; n. 396, 2013.

SANDERS, M. E. et al. Probiotics for human use. **Nutrition Bulletin**. v. 43, p. 212-225, 2018.

SANTO, A. P. E. et al. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. **International Dairy Journal**. v. 20, p. 415-422, 2010.

SANTOS, K. M. D. et al. Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content probiotic viability and sensory acceptability. **J Sci Food Agric**, v. 97, p. 1108-1115, 2017.

SAUER, M. et al. The efficient clade: Lactic acid bacteria for industrial chemical production. **Trends in Biotechnology**. v. 35, n. 8, p. 756-769, 2017.

SENADEERA, S. S. et al. Antioxidant, physicochemical, microbiological, and sensory properties of probiotic yoghurt incorporated with various *Annona* species pulp. **Heliyon**. v. 4, 2018.

SENDRA, E. et al. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiology**. v. 25, p. 13-21, 2008.

SILVA, H. R. et al. TECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF LACTIC ACID BACTERIA (bals) IN MILK PRODUCTS. **Revista ingi**. v. 4, n. 1, p. 681-690, 2020.

SILVA, L. G; LOPES, D. S; BASTOS, P. A. M. B. Caracterização de bactérias ácido lácticas autóctones de Bom Jesus do Itabapoana/RJ: ação antagonista contra *Listeria monocytogenes* e provas bioquímicas. **Essentia Editora Iffluminense**. v. 24, n. 1, p. 194-208, 2022.

SILVA, L. P. et al. Análises físico-químicas de leite em um laticínio sob serviço de inspeção federal. **CESUMAR**. v. 21, n. 2, p. 175-187, 2019.

SILVA, P. O. et al. Population structure of *Annona coriacea* Mart. (*Annonaceae*) in different phyto physiognomies of the Cerrado. **Comunicata Scientiae**. 2020.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult**. v.16, p. 144-158, 1965.

SKRZYPCZAK, K. et al. Reinforcement of the antioxidative properties of chickpea beverages through fermentation carried out by probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2019.

SOUZA, A. H. P. et al. Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of the milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum. Ciências da Saúde*, v. 35, n. 1, p. 125-131, 2013.

SUNANLIGANON, C.; THONG-NGAM, D.; TUMWASORN, S. et al. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. **World J. Gastroenterol**, v.18, p.2472-2480, 2012.

TODOROV, S. V.; MELO FRANCO, B. D. G. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. **Food Ver. Int**, v.26, p.205–229, 2010.

TRIPATHI, MK; GIRI, SK. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Functional food magazine**. Índia, v. 9, p. 225-241, 2014.

VALERO-CASES, E; FRUTOS, M. J. Effect of Inulin on the Viability of *L. plantarum* during Storage and In Vitro Digestion and on Composition Parameters of Vegetable Fermented Juices. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 37, n. 2, 2017.

VENTURINI, K. S; SARCINELLI, M. F; SILVA, L. C. Características do Leite. Universidade Federal do Espírito Santo - **UFES**. 2007.

WORKU, T; NEGERA, E; NURFETA, A; WELEAREGAY, H. Microbiological quality and safety of raw milk collected from Borana pastoral community, Oromia Regional State. **Afr J Food Sci Technol** 3(9): 213-222. 2012.

ZAABOUL, F., RAZA, H., CAO, C., & YUANFA, L. (2019). The impact of roasting, high pressure homogenization and sterilization on peanut milk and its oil bodies. **Food Chemistry**, 280, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.047>.

ZARE, F. et al. Effect of the addition of pulse ingredients to milk on acid production by probiotic and yogurt starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 155–160, 2012.

ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**. p. 103-123, 2020.

CAPÍTULO 2

Artigo original

Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos

Efeito da adição de farinha de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no leite, fermentado por potenciais probióticos

Larissa dos Santos Freitas^a, Sandra Fernandes Arruda^b, Maria Carolina Mesquita dos Santos^b, Thalysom Guirra Eneias^a, Wallas Felipe de Souza Ferreira^c, Márcio Antônio Mendonça^a.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade De Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brasil.

^b Departamento de Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910900, Brasil

^c Associação Nacional dos Exportadores de Cereais - ANEC

Financiamento: Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e ao Programa De Apoio À Pós-Graduação (PROAP).

Resumo

Introdução: O leite possui em sua composição nutrientes essenciais para a saúde humana, como lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, por possuir muitos nutrientes, ele é considerado uma excelente matriz para as bactérias lácticas. As bactérias lácticas são responsáveis por realizar o processo de fermentação, esse processo também é de grande interesse para as indústrias alimentícias, pois por meio dele é possível aumentar o tempo de prateleira dos produtos e protegê-los contra patógenos. Os probióticos são benéficos à saúde humana, pois eles modificam a flora intestinal, fortalecem o sistema imunológico, exercem proteção contra microrganismos patogênicos e ainda melhoram valor nutricional aos produtos que foram inseridos. Para que uma bactéria láctica seja considerada probiótica é necessário que ela seja segura, apresente resistência à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), apresente atividade antimicrobiana e capacidade de aderir ao epitélio intestinal. As matrizes lácteas também são excelentes matrizes, pois aumentam a resistência e protegem os probióticos durante a passagem pelo TGI. Apesar de apresentar alta tolerância ao TGI, o *L. plantarum* não consegue se desenvolver adequadamente no leite, pois não utiliza de forma eficiente os substratos presentes no leite, como a caseína e lactose. Uma forma de aumentar a viabilidade do *L. plantarum* no leite é fornecer substratos necessários por meio de suplementações com fontes de aminoácidos. A farinha de grão-de-bico é fonte de proteína, aminoácidos essenciais, minerais e carboidratos. **Objetivo:** Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do leite fermentado com duas bactérias potencialmente probióticas, *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7, enriquecido ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico. **Metodologia:** Para elaboração das formulações foi utilizado leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%, sacarose e farinha de grão-de-bico. Quatro formulações foram elaboradas: (i) (FC1) LDR a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL; (ii) (FT1) LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL + farinha de grão-de-bico (4,5%); (iii) (FC2) LDR a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log UFC /mL; (iv) (FT2) LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log UFC /mL + farinha de grão-de-bico (4,5%). As características físico-químicas (pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, estabilidade durante o armazenamento, capacidade de retenção de água, fenólicos totais e atividade antioxidante) e microbiológicas (viabilidade e simulação *in vitro*) foram avaliadas em todas as formulações. **Resultados:** A formulação teste com a adição de 4,5% de farinha de grão-de-bico (FT1) apresentou valores significativamente menores ($P < 0,05$) de pH e valores significativamente maiores ($P < 0,05$) de acidez titulável durante a fermentação de 24 horas em

relação as formulações controle (FC1). O mesmo foi observado na formulação FT2 em relação ao controle (FC2). Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as formulações em relação ao teor de proteína, já em relação aos teores de carboidratos e cinzas, as formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram teores significativamente ($P < 0,05$) maiores. Durante o armazenamento refrigerado, as formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram valores significativamente menores ($P < 0,05$) de pH e SST e valores significativamente maiores de ($P < 0,05$) de acidez titulável e viabilidade dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7, em relação as formulações controles FC1 e FC2 (independente da estirpe). Além disso, as formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram uma melhor estabilidade durante armazenamento (mL) no 28º dia de armazenamento, em relação as formulações controle FC1 e FC2 (independente da estirpe). Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a sobrevivência dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 sob condições simuladas *in vitro* do TGI nas diferentes formulações. As formulações FT1 e FT2 (independente da estirpe), com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentaram valores significativamente maiores ($P < 0,05$) de fenólicos totais, durante a fermentação (24 horas) e armazenamento (0 e 28 dias), em relação as formulações controle FC1 e FC2 (independente da estirpe). **Conclusão:** A adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico aumentou a viabilidade dos potenciais probióticos *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 durante o armazenamento de 28 dias, reduziu a sinérese durante armazenamento e aumentou o teor de fenólicos totais durante a fermentação (24 horas) e armazenamento (0 e 28 dias).

Palavras-chave: Leite; bactérias lácticas; farinha de grão-de-bico; viabilidade; potencial probiótico.

1 Introdução

Atualmente, a procura por alimentos saudáveis e funcionais estão cada vez maiores, o consumidor está em busca de produtos benéficos a saúde. O leite fermentado é considerado um alimento funcional, pois além de auxiliar na nutrição básica, é benéfico à saúde devido a presença de bactérias lácticas e metabólitos oriundos do processo de fermentação. Portanto, o processo de fermentação além de melhorar características como sabor e aroma, também é capaz de agregar valor nutricional ao produto (SILVA, 2020; OLIVEIRA, 2011; LIANG et al., 2024).

Considera-se leite fermentado, produtos acrescentados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e redução do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica a partir ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes micro-organismos específicos necessitam ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (MAPA, 2007).

As bactérias lácticas (BALs) apresentam metabolismo fermentativo e são caracterizadas como Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, anaeróbias facultativas (LUNARDI et al., 2021). Essas bactérias lácticas podem ser divididas em homofermentativas (converte a glicose unicamente em ácido láctico) e heterofermentativas (além do ácido láctico, também sintetizam ácido acético ou etanol e CO₂) (SILVA, 2022). A grande maioria das BALs possuem status GRAS (Generally Recognized as Safe), por esse motivo são utilizadas em indústrias alimentícias. No processo de fermentação, as BALs ao metabolizarem os carboidratos promovem a queda no pH, criando um ambiente inadequado para o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos (PEREIRA, 2020; SILVA et al., 2020).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Para uma bactéria láctica ser considerada probiótica, é preciso que ela tenha status GRAS (Generally Recognized as Safe), apresentar resistência às condições adversas do trato gastrointestinal, como, por exemplo, o pH ácido do suco gástrico, ação de enzimas (pepsina e protease) e ação dos sais biliares. É necessário apresentar também atividade antimicrobiana e capacidade de aderência ao epitélio intestinal, mantendo-se viável (sobrevivência não deve ser inferior a 10⁶ UFC/g). Além disso, é importante que ela tenha resistência a antibióticos e não possua efeitos adversos à saúde (COSTA et al., 2019). Os probióticos são benéficos à saúde, pois,

maximizam o valor nutricional dos alimentos, são capazes de reduzir o colesterol sérico, prevenir e retardar infecções intestinais, diminuir os sintomas que estão associados a intolerância à lactose e o risco de câncer de cólon (ZENDEBOODI et al., 2020).

O *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria láctica (BAL) gram-positiva, anaeróbia, mesófila e heterofermentativa facultativa. Possui status GRAS (Generally Recognized as Safe) e pode ser isolado de diversos nichos ecológicos, dentre eles: carne, frutas, legumes, leite, silagem e estômago de humanos e animais) (TODOROV, 2010; SOUZA et al., 2013). O *L. plantarum* pode ser utilizado em diversos produtos alimentícios (cereais, carne, vegetais e bebidas fermentados e laticínios), sendo capaz de favorecer a formação das características sensoriais dos produtos (sabor e textura) devido a síntese de ácido lático e outros ácidos orgânicos (ácido acético) por exemplo. Além disso, algumas cepas são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos (bacteriocinas) contribuindo para a segurança do alimento e preservando-o por mais tempo (SOUZA et al., 2013; LIU, 2018; HANG et al., 2020).

O microrganismo *L. plantarum* também apresenta tolerância a acidez do estômago, enzimas e sais biliares, conseguindo se manter viável e aderir-se ao epitélio intestinal. Além disso, os efeitos benéficos do *L. plantarum*, destacam-se: regulação do sistema imunológico, auxílio em casos de intolerância à lactose, inibição do crescimento de patógenos e prevenção de doenças cardiovasculares (SUNANLIGANON et al., 2012; HAMEED et al., 2021).

Apesar do leite ser uma matriz adequada para o crescimento de bactérias lácticas, o *L. plantarum* não consegue se desenvolver e se manter adequadamente viável no leite sem qualquer suplementação. Isso ocorre, pois, o *L. plantarum* apresenta uma baixa capacidade proteolítica, e, portanto, não consegue hidrolisar e utilizar de maneira eficiente a caseína do leite. Portanto, o desenvolvimento do *L. plantarum* no leite depende da suplementação do leite com fontes de vitaminas, compostos bioativos, minerais e aminoácidos livres (MA et al., 2016; HANG et al., 2020; NATH et al., 2020).

Por isso a, farinha de grão-de-bico pode contribuir por ser fonte de fibras, carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos), minerais (potássio, cálcio, sódio, magnésio, cobre, ferro e zinco), vitaminas, aminoácidos essenciais e compostos fitoquímicos (carotenoides, fenólicos e isoflavonas) (FERNANDES et al., 2022; RACHWA-ROSIK, 2015; MARGIER et al., 2018). O grão-de-bico possui em sua composição, componentes prebióticos, importantes para a suplementação em bebidas probióticas. As leguminosas, como

o grão-de-bico podem agregar valor nutricional ao leite e auxiliar no crescimento bacteriano (ZARE et al., 2012).

Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do leite fermentado com os potenciais probióticos *Lactobacillus plantarum* S180.7 ou *Lactobacillus plantarum* SBR64.7, enriquecidos ou não, com 4,5 % de farinha de grão-de-bico.

2 Materiais e métodos

2.1 Preparo da cultura estoque dos micro-organismos *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7

As culturas utilizadas foram *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7, as quais pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Higiene dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Para ativação das culturas, 100 µL da cultura estoque armazenada a - 80° C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) foram adicionados em um tubo de vidro contendo 5 mL de caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Acumedia-Neogen, Michigan, EUA) e incubadas em estufa bacteriológica (Ethik Technolgy, Vargem Grande, SP) a 37°C por 24 horas. Em seguida as culturas foram ressuspendidas em caldo MRS contendo 20% glicerol e armazenadas a -80°C (ultra freezer modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos). Todos os experimentos foram realizados a partir da cultura estoque (MESQUITA et al., 2020).

2.1.1 Ativação dos micro-organismos e padronização das culturas *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7

Alíquotas de 100 µL de cada uma das culturas estoque, *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7, foram ativadas em 5 mL de caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Acumedia-Neogen, Michigan, EUA) e incubadas em estufa bacteriológica (Ethik Technolgy, Vargem Grande, SP) a 37°C por 24 horas. Alíquotas de 200 µL (inoculo de 2%) de cada cultura estoque, previamente ativada, foram adicionadas em tubos contendo 10 mL de caldo MRS, e incubadas a 37°C por 24 horas. Os tubos foram centrifugados a 4°C, 5.000 rpm / 5 minutos e o *pellet* obtido foi lavado duas vezes com solução salina 0,85%. Posteriormente, a cultura ativa foi inoculada (inoculo de 1,0 %, contendo aproximadamente 6×10^8 UFC/mL)

em frascos contendo 100 mL das formulações (controle e teste), e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica.

2.2 Elaboração das formulações a base de leite desnatado reconstituído e enriquecido ou não com farinha de grão-de-bico, e adicionadas dos potenciais probióticos *Lactobacillus plantarum* S180.7 ou *Lactobacillus plantarum* SBR64.7

Foram elaboradas quatro formulações:

1. Formulação Controle 1 (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL;
2. Formulação Teste 1 (FT1): LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* S180.7 8 log UFC/mL + farinha de grão-de-bico (4,5%);
3. Formulação Controle 2 (FC2): leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (100%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log UFC/mL;
4. Formulação Teste 2 (FT2): LDR 10% (95,5%) + 10% de sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 8 log UFC/mL + farinha de grão-de-bico (4,5%).

Todas as formulações foram homogeneizadas em liquidificador (Walita modelo RI7630/22) em potência 1 por 30 segundos, e autoclavadas a 121°C por 20 minutos. Em seguida foram armazenados sob refrigeração a 4°C por 16 horas, e então inoculadas com as culturas.

2.3 Determinação da cinética de crescimento dos micro-organismos *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas diferentes formulações

Os parâmetros avaliados foram: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e viabilidade microbiana. As análises foram feitas em intervalos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas de fermentação.

2.3.1 pH, Acidez e Sólidos solúveis totais

O pH das formulações (FC1, FT1, FC2 e FT2) foi mensurado em pHmetro digital (PHS – 3E, Birigui, Araucária-PR, Brasil), utilizando 10 g de cada formulação, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para a análise de acidez titulável, alíquotas de 10 g de cada formulação foram homogeneizadas em 100 mL de água destilada e em seguida tituladas com NaOH 0,1 mol/L contendo solução de fenolftaleína (IAL,2008).

$$\text{Acidez titulável} = V \times F \times M \times 100/P$$

Onde:

V = volume da solução NaOH 0,1 mol/L usado na titulação (mL)

M = molaridade da solução de NaOH

P = quantidade de amostra (g)

F = Fator de correção da solução de NaOH

Os sólidos solúveis totais foram quantificados utilizando aparelho refratômetro digital (ATAGO®, modelo 1 T), de acordo com o método 932.12 (AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em °Brix.

2.3.2 Viabilidade

A viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas diferentes formulações foi determinada a partir da técnica *Drop plate*. As amostras foram submetidas a diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,85% m/v) e plaqueadas em placas de Petri, contendo o meio de cultura MRS ágar. Logo após, foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e os resultados foram expressos em log UFC/mL (MESQUITA et al., 2020).

2.4 Determinação da composição química centesimal das formulações

Foi realizada a determinação do teor de umidade, lipídios, cinza, fibra bruta, carboidratos totais e proteínas das diferentes formulações (FC1, FT1, FC2 e FT2) foi analisada. A umidade foi determinada de acordo com as Normas Analíticas do Instituto

Adolfo Lutz (IAL, 2008). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Kjeldahl 991.22 (AOAC, 2005).

A concentração de lipídio total das formulações foi determinada através do método de extração Am 5-04, utilizando o extrator de lipídios (ANKOM XT15, Ankom Technology, New York, United States of America) (AOCS, 2005). A análise de resíduo mineral (cinzas) foi realizada pelo método 945.45 (AOAC, 2005). A quantificação de fibra bruta das formulações foi determinada pela metodologia 978.10 da AOAC (2005). O teor de carboidratos totais presentes nas formulações foi determinado por diferença, subtraindo de 100 os valores de umidade, proteínas, lipídios e cinzas, com base no método 986.25 (AOAC, 2005).

2.5 Caracterização físico-química e microbiológicas das formulações durante armazenamento refrigerado

Os parâmetros tecnológicos pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais e a viabilidade dos micro-organismos das formulações foram analisados durante o período de armazenamento (0, 7, 14, 21 e 28 dias) a 4°C. Os valores de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, viabilidade e bolores e leveduras foram avaliados nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Enquanto a estabilidade e a capacidade de retenção de água foram avaliadas nos dias 0 e 28 de armazenamento.

Os parâmetros tecnológicos pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais foram determinados conforme descrito no item “2.3.1”.

2.5.1 Estabilidade física

Para a análise de estabilidade física durante armazenamento, foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada formulação e armazenadas em tubos de vidro de 10 mL a 4°C por 0 e 28 dias. Nos dias 0 e 28 de armazenamento foi determinada a separação de fases (sobrenadante e *pellet*), através da determinação da altura do sobrenadante com auxílio de escalímetro, os valores foram obtidos em mm, e convertidos em mL (ZAABOUL et al., 2019).

2.5.2 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água foi determinada a partir do método de Guzman-Gonzalez et al. (1999), com algumas modificações. Alíquotas de 25 mL de cada formulação foram centrifugadas a 500xg por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e pesado. A capacidade de retenção de água foi estimada a partir da seguinte equação:

$$WHC = \left(1 - \frac{m_S}{m_Y}\right) \cdot 100\%$$

Em que:

WHC = capacidade de retenção de água da amostra;

ms = massa (g) sobrenadante após a centrifugação;

my = massa (g) da formulação pesada inicialmente.

2.5.3 Viabilidade

A viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 durante o período de armazenamento foi avaliada de acordo com o procedimento descrito no item “2.3.2”.

2.6 Sobrevivência de *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 nas formulações, após exposição *in vitro* às condições simuladas do trato gastrointestinal

A viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas diferentes formulações foi determinada: (i) antes da exposição ao suco gástrico e pancreático, (ii) após exposição ao suco gástrico, (iii) após exposição ao suco pancreático e (iv) após exposição ao suco gástrico e pancreático em condições sucessivas.

(i) Viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 antes da exposição ao suco gástrico e pancreático.

Alíquotas de 100 µL de cada formulação foram transferidas para microtubos contendo 900 µL de salina 0,85% e em seguida foram realizadas diluições seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁶. O

plaqueamento foi feito a partir da técnica *Drop Plate*, em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar MRS. As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas. A contagem de UFC foi determinada após o período de incubação e expressa em log UFC/mL.

(ii) Viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 após a digestão gástrica simulada.

O suco gástrico sintético foi produzido a partir do protocolo de Bautista-Gallego et al. (2013), com modificações. O tampão contendo NaCl (0,205 g/L), K₂HPO₄ (0,060 g/L), CaCl₂ (0,011 g/L), KCl (0,037 g/L) e 100 mL de água destilada, pH 2,0 foi autoclavado a 121° C por 21 minutos. Em seguida 360 µL da enzima pepsina (0,6 %) (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil) foram adicionados à solução tampão autoclavada.

Alíquotas de 200 µL de cada uma das formulações foram transferidas para microtubos, adicionou-se 200 µL de suco gástrico e foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 90 min. O tempo de exposição foi estabelecido de acordo com a metodologia de Calabuig-Jiménez et al., (2019). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm a 4° C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 400 µL solução salina 0,85% por duas vezes. Diluições seriadas foram realizadas de 10⁻¹ até 10⁻⁶. O plaqueamento foi realizado por meio da técnica *Drop Plate*, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar MRS. As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas. A contagem de UFC foi determinada após o período de incubação, e expressa em log UFC/mL.

(iii) Viabilidade das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 após digestão pancreática simulada.

O suco pancreático foi produzido a partir do protocolo de Bautista-Gallego et al. (2013), com algumas modificações. O tampão pancreático contendo K₂H₂PO₄.7H₂O (5,081 g/L), NaCl (0,85 g/L), sais biliares (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich®) e 100 mL água destilada, pH 8,0 foi autoclavado a 121° C por 21 minutos. 60 µL da enzima pancreatina (0,1 %) (marca Sigma-Aldrich®) foram adicionados à solução tampão autoclavada.

Alíquotas de 200 µL de cada uma das formulações foram transferidas para microtubos, adicionou-se 200 µL de suco pancreático e as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 90 min. O tempo de exposição foi estabelecido de acordo com a metodologia descrita por Calabuig-Jiménez et al. (2019). As etapas de centrifugação e

plaqueamento das amostras em ágar MRS foram feitas de acordo com a metodologia descrita no item (ii). A contagem de UFC foi realizada após o período de incubação e expressa em log UFC/mL

(iv) Exposição das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 sucessiva aos sucos gástrico e pancreático.

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita nos itens (ii) e (iii), porém após a exposição ao suco gástrico por 90 min, as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm a 4° C por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 200 µL de suco pancreático, posteriormente incubado a 37°C por 90 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e levadas com solução salina 0,85%, como descrito no item (ii) foi repetido. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

A porcentagem de sobrevivência das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7, foi determinada por meio da seguinte equação:

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \log N1 / \log N0 \times 100$$

Em que:

N1 = contagem (log UFC/mL) após a exposição as condições de estresse gastrointestinal in vitro.

N0 = contagem (log UFC/mL) antes da exposição as condições de estresse gastrointestinal in vitro.

2.7 Concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações

As análises de fenólicos totais e atividade antioxidante foram realizadas com as alíquotas das formulações, coletadas durante o experimento de cinética de crescimento (0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) e de armazenamento (0 e 28 dias).

2.7.1 Preparo das amostras

As amostras foram clarificadas a partir da metodologia descritas por CARREZ. (1909) e ACKER et al., (1967) com modificações. Os reagentes utilizados para a clarificação das amostras foram Carrez I - Ferrocianeto de Potássio thihidratado (15g $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ /100

mL água Mili-Q) e Carrez II – Sulfato de Zinco heptahidratado (30g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /100 mL água Mili-Q).

500 μL de cada formulação foram adicionados a 10 μL da solução Carrez I (15% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$) e 10 μL da solução Carrez II (30% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), e o volume final de reação completado para 1 mL com água Mili-Q. Após homogeneização, os microtubos foram centrifugados a 7.800xg por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado a -80 °C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) para posterior análises.

2.7.2 Fenólicos Totais

A análise de fenólicos totais foi determinada a partir do protocolo estabelecido por SINGLETON e ROSSI (1965). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 20 μL das amostras clarificadas, 100 μL da solução de Folin-Ciocalteu (diluída 1/10 v/v) e 80 μL de solução de Na_2CO_3 7,5%. Após 60 minutos de incubação da reação sob proteção da luz foi determinada a absorbância a 765 nm, em espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California). Para quantificação foi utilizada uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 1.000 $\mu\text{mol/L}$ e a concentração de fenólicos totais das formulações foi expressa em μmol ácido gálico/L leite fermentado.

2.7.3 Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP)

A atividade antioxidante das formulações foi determinada pelo ensaio FRAP segundo metodologia descrita por BENZIE e STRAIN (1996). O ensaio foi realizado em microplacas utilizando 4 μL de água Mili-Q, 20 μL de amostra clarificada e 180 μL do reagente FRAP. A leitura da absorbância foi determinada a 593 nm a cada 30 segundos, por 10 minutos em espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California). Uma curva padrão de hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX, Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) nas concentrações de 0 a 1.500 $\mu\text{mol/L}$ foi construída e os resultados expressos em μmol TROLOX / L leite fermentado.

2.7.4 Capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

A capacidade antioxidante das formulações foi determinada utilizando a metodologia de eliminação de radicais livres segundo descrito por CHENG et al., (2006). As amostras foram analisadas em cinco concentrações diferentes (5, 10, 20, 30 e 40 µL), sendo que o volume final foi de 100 µL, completado com água Mili-Q. Em seguida 100 µL do reagente DPPH• 0,208 mmol/L foram adicionados à reação, e a absorbância determinada a 515 nm a cada 30 segundos por 30 minutos em espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California).

Uma curva padrão de hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) nas concentrações de 0 a 50 µmol/L foi construída e o potencial antioxidante das amostras foi calculado mediante a fórmula descrita abaixo:

$$DRSC = \frac{AUC \text{ Sample}}{AUC \text{ TROLOX}} \times \frac{[\text{Sample } \mu\text{L}]}{[\text{TROLOX } \mu\text{L}]}$$

Onde:

DRSC = capacidade relativa de eliminação do radical DPPH•

AUC = área abaixo da curva, que é calculada a partir das variáveis “tempo de reação” x % DPPH• “eliminado”.

2.8 Análise estatística dos resultados

O trabalho foi realizado a partir do Delineamento Inteiramente Casualizado em Esquema Fatorial 4 x 6 x 5, sendo 4 formulações (FC1, FT1, FC2 e FT2), 6 tempos em horas (0, 3, 6, 9, 12 e 24) e 5 tempos em dias (0, 7, 14, 21 e 28). O desenho experimental do estudo foi formado por quatro formulações a base de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% adicionado de *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR 64.7, e enriquecido ou não com 4,5 % de farinha de grão-de-bico. Sendo seis medidas (horas) diferentes de intervalos de tempo para cinética de crescimento e cinco medidas (dias) diferentes de intervalos de tempo de armazenamento (exceto para análise de composição centesimal e sobrevivência em condições gastrointestinais in vitro).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e o teste Scott-Knott foram utilizados para calcular diferenças significativas em $P < 0.05$. Os dados analisados nos intervalos de tempo de fermentação e cinética de crescimento foram

submetidos à análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR (versão 5.6). O software SigmaPlot versão 14.0 foi utilizado para obtenção das equações e construção dos gráficos.

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação da cinética de crescimento dos micro-organismos *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas diferentes formulações

3.1.1 pH e Acidez titulável.

Os valores de pH e a acidez titulável das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas, podem ser observados na Tabela 1. Declínio nos valores de pH foram vistos em todas as formulações, durante o período de fermentação (24 horas). Enquanto, os valores de acidez titulável apresentaram aumento em todas as formulações, durante período de fermentação (24 horas) (Tabela 1).

Os valores de pH com 0 horas de fermentação foram de $6,35 \pm 0,01$ (FC1); $6,36 \pm 0,01$ (FT1); $6,28 \pm 0,01$ (FC2) e $6,32 \pm 0,01$ (FT2) e com 24 horas de fermentação os valores de pH foram de $5,77 \pm 0,01$ (FC1); $4,55 \pm 0,01$ (FT1); $5,76 \pm 0,01$ (FC2) e $4,94 \pm 0,05$ (FT2). Maior queda nos valores de pH foi observada nas formulações com a adição da farinha de grão-de-bico (FT1 e FT2), que apresentaram valores significativamente menores ($P > 0,05$), quando comparadas as formulações controles FC1 e FC2 nos tempos 12 e 24 horas de fermentação.

Em relação aos valores de acidez titulável, com 0 horas de fermentação, os valores foram de $0,16 \pm 0,00$ (FC1); $0,19 \pm 0,01$ (FT1); $0,17 \pm 0,00$ (FC2) e $0,21 \pm 0,01$ (FT2) (g/100 g de ácido láctico) e com 24 horas de fermentação os valores de acidez titulável foram de $0,22 \pm 0,01$ (FC1); $0,49 \pm 0,02$ (FT1); $0,22 \pm 0,01$ (FC2) e $0,39 \pm 0,05$ (FT2) (g/100 g de ácido láctico). As formulações FT1 e FT2 apresentaram valores significativamente maiores ($P > 0,05$), diferindo-se das formulações FC1 e FC2 nos tempos 12 e 24 horas de fermentação.

Os principais metabólitos provenientes do processo de fermentação das BALs são os ácidos orgânicos. O pH mais baixo proporciona um ambiente favorável para o crescimento das BALs (ZHU et al., 2023). Por a sacarose ser fonte de carbono, as BALs podem usar a sacarose como substrato para realizarem a fermentação, resultando no aumento de ácido

lático. Devido a farinha de grão-de-bico ser rica em fibras, monossacarídeos e dissacarídeos, quando adicionada ao leite, a farinha fornece quantidade maior de carboidratos, assim potencializando o processo de fermentação (DAVOODI et al. 2016; MARGIER et al., 2018).

Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Coman et al., 2013, no qual a suplementação com farinha de trigo sarraceno e farelo de aveia no leite fermentado pelas bactérias *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® e *Lactobacillus paracasei* IMC 502® resultaram em um decréscimo de pH.

Tabela 1 pH e acidez titulável (g/100 g de ácido lático) das formulações a base de leite, adicionadas de farinha de grão-de-bico e fermentadas por as estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 durante período de 24 horas..

Análises	Formulações	Tempo de fermentação (horas)					
		0	3	6	9	12	24
pH	FC1	6,35 ± 0,01 aA	6,36 ± 0,01 aA	6,33 ± 0,02 aA	6,13 ± 0,01 aB	6,13 ± 0,03 aB	5,77 ± 0,01 aC
	FT1	6,36 ± 0,01 aA	6,36 ± 0,02 aA	6,33 ± 0,01 aB	5,68 ± 0,01 aC	5,35 ± 0,03 bD	4,55 ± 0,01 bE
	FC2	6,28 ± 0,01 aA	6,20 ± 0,02 aC	6,23 ± 0,01 aB	6,13 ± 0,01 aC	6,08 ± 0,01 aD	5,76 ± 0,01 aE
	FT2	6,32 ± 0,01 aA	6,22 ± 0,01 aB	6,17 ± 0,01 aC	5,65 ± 0,02 aD	5,42 ± 0,01 bE	4,94 ± 0,05 bF
Acidez Titulável	FC1	0,16 ± 0,00 aC	0,17 ± 0,01 aC	0,17 ± 0,02 aB	0,18 ± 0,00 aB	0,19 ± 0,01 bB	0,22 ± 0,01 bA
	FT1	0,19 ± 0,01 aE	0,19 ± 0,00 aE	0,22 ± 0,01 aD	0,29 ± 0,00 aC	0,34 ± 0,02 aB	0,49 ± 0,02 aA
	FC2	0,17 ± 0,00 aC	0,17 ± 0,01 aC	0,18 ± 0,00 aC	0,20 ± 0,01 aB	0,19 ± 0,00 bB	0,22 ± 0,01 bA
	FT2	0,21 ± 0,01 aC	0,22 ± 0,01 aC	0,23 ± 0,01 aC	0,31 ± 0,02 aB	0,35 ± 0,01 aB	0,39 ± 0,05 aA

(FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). Letra minúscula representa diferença estatística entre formulações em um mesmo tempo de fermentação ($P > 0,05$) e letra maiúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott.

Tabela 2 Equações de regressão que descrevem os dados de sólidos solúveis totais, viabilidade, fenólicos totais, FRAP e DPPH ao longo da cinética de crescimento das estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7.

Variáveis	Experimento	Equação de regressão	R ²	SEM
SST	Curva de Crescimento - FC1	$Y = 17,63 + 0,090x - 0,0054x^2$	0,77	0,53
	Curva de Crescimento - FT1	$Y = 19,70 + 0,145x - 0,0116x^2$	0,98	0,36
	Curva de Crescimento - FC2	$Y = 18,40 - 0,022x - 0,0018x^2$	0,95	0,23
	Curva de Crescimento - FT2	$Y = 19,99 + 0,046x - 0,0068x^2$	0,99	0,13
Viabilidade	Curva de Crescimento	$Y = 5,8796 + \frac{2,1550}{\left[1 + e^{-\left(\frac{x-4,6890}{1,4684}\right)^{1,1334}}\right]}$	0,99	0,06
Fenólicos Totais	Curva de Crescimento - FC1 e FC2	$Y = 690,43 - 5,324x + 0,0992x^2$	0,86	18,85
	Curva de Crescimento - FT1 e FT2	$Y = 1195,62 - 44,860x + 1,343x^2$	0,97	37,8
FRAP	Curva de Crescimento - FC1	$Y = 131,08 - 5,945x + 0,1676x^2$	0,99	3,78
	Curva de Crescimento - FT1	$Y = 123,16 - 8,228x + 0,2605x^2$	0,98	5,98
	Curva de Crescimento - FC2	$Y = 121,68 - 1,230x + 0,0132x^2$	0,92	4,22
	Curva de Crescimento - FT2	$Y = 128,56 - 6,905x + 0,2245x^2$	0,81	17,19
DPPH	Curva de Crescimento - FC1	$Y = 2,18 - 0,125x + 0,0038x^2$	0,68	0,49
	Curva de Crescimento - FT1	$Y = 2,19 - 0,093x + 0,0037x^2$	0,37	0,76
	Curva de Crescimento - FC2	$Y = 2,17 - 0,126x + 0,0050x^2$	0,55	0,63
	Curva de Crescimento - FT2	$Y = 1,81 + 0,028x - 0,0019x^2$	0,41	0,59

SEM: erro padrão da média

3.1.2 Sólidos solúveis totais

Os valores de SST (°Brix) das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 por período de 24 horas, podem ser observados na Figura 1 A e B, Tabela 2. O comportamento dos SST entre as formulações FC1 e FC2 foi semelhante. As formulações FT1 e FT2 também tiveram comportamento semelhante. Todas as formulações apresentaram tendência de declínio, com diferenças significativa ($P > 0,05$) entre as formulações e ao longo do tempo de fermentação.

Inicialmente, com 0 horas de fermentação as formulações FC1 e FT1 (Figura 1 A) apresentaram valor de sólidos solúveis totais de $18,10 \pm 0,44$ e $19,77 \pm 0,55$ °Brix respectivamente, e ao final da fermentação, os valores de sólidos solúveis totais foram de $16,77 \pm 0,45$ e $16,50 \pm 0,40$ °Brix, respectivamente. As formulações FC2 e FT2 (Figura 1 B), com 0 horas de fermentação apresentaram valor de sólidos solúveis totais de $18,60 \pm 0,10$ e $20,10 \pm 0,26$ °Brix respectivamente, e ao final da fermentação, os valores de sólidos solúveis totais foram de $16,83 \pm 0,72$ e $17,17 \pm 0,57$ °Brix, respectivamente.

Com 3 e 6 horas de fermentação (figura 1 A), a formulação FT1 apresentou valores de sólidos solúveis totais ($19,69 \pm 0,45$ e $20,63 \pm 0,21$ °Brix) significativamente maiores ($P > 0,05$), comparada a formulação FC1 ($17,20 \pm 0,17$ e $18,43 \pm 0,25$ °Brix). A formulação FT2, com 3 e 6 horas de fermentação (figura 1 B) apresentou valores de sólidos solúveis totais ($19,93 \pm 0,12$ e $20,00 \pm 0,20$ °Brix) significativamente maiores ($P > 0,05$), comparada a formulação FC2 ($18,10 \pm 0,20$ e $18,10 \pm 0,17$ °Brix).

O grão-de-bico é rico em oligossacarídeos (rafinose e ciceritol), isso explica maiores teores de SST. Para a realização do processo de fermentação, tendo como um dos produtos finais o ácido láctico, as BALs hidrolisam açúcares (fontes de carbono), isso causa queda contínua do teor de açúcar solúvel durante a fermentação (HUSSEIN et al., 2020; ZHU et al., 2023). Resultados similares foram relatados por Norberto et al., (2018), que observaram diminuição dos SST em bebida de soja fermentada por grãos de kefir, devido ao consumo de carboidratos ao longo do processo de fermentação.

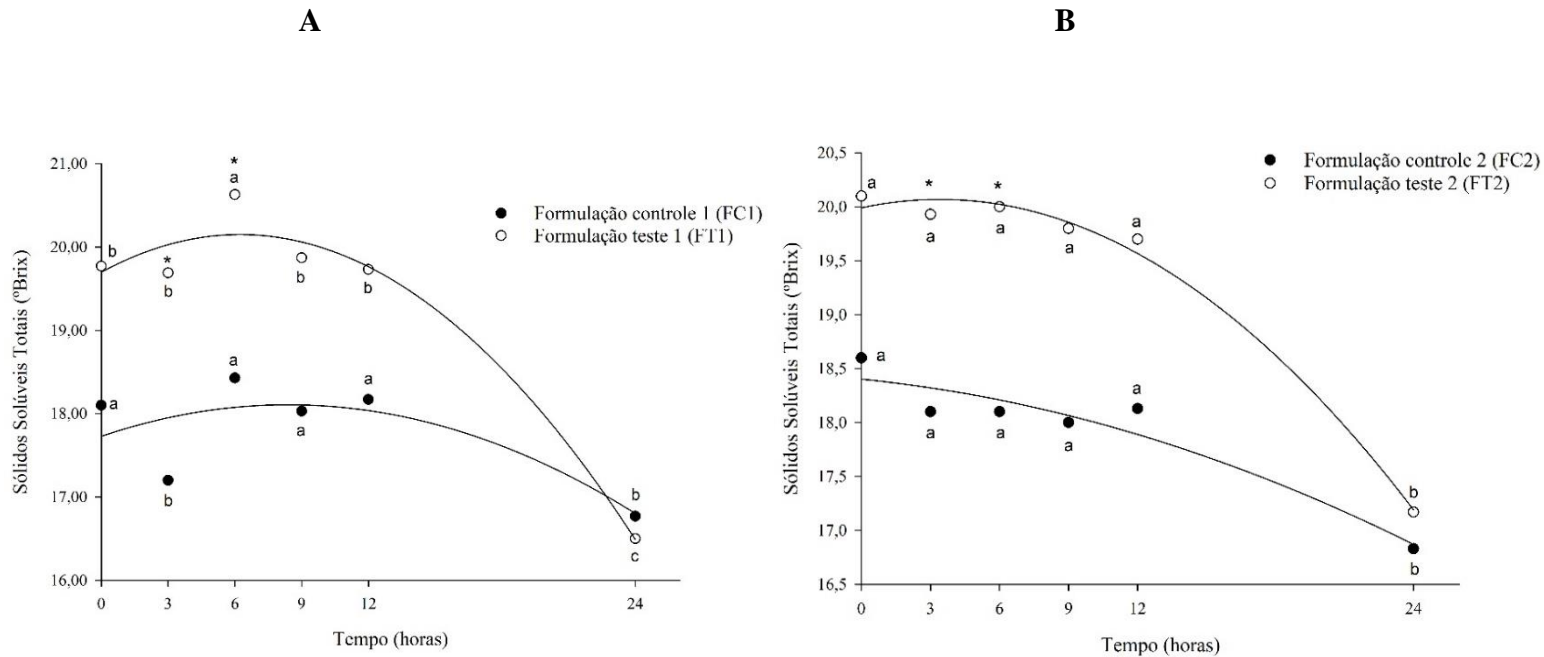


Figura 1 Sólidos solúveis totais (°Brix) das formulações FC1, FT1 (A), FC2 e FT2 (B), ao longo do tempo de fermentação. *Diferenças estatísticas ($P > 0,05$) comparando formulação controle contra formulação teste com adição de farinha. Letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott.

3.1.3 Viabilidade

Os valores de viabilidade das estirpes *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico e fermentadas por período de 24 horas, podem ser observados na Figura 2, Tabela 2. O comportamento de viabilidade ao longo do processo de fermentação de todas as formulações foi semelhante, onde apresentaram tendência de aumento, independentemente da adição ou não da farinha de grão-de-bico ($P > 0,05$).

Além disso, as formulações fermentadas por ambas as estirpes (*L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7) não diferiram significativamente entre si e ao longo do período de fermentação (24 horas) ($P > 0,05$). Logo, todas as formulações, independentemente da estirpe, ou adição de farinha apresentaram tendência semelhante (Figura 2) de aumento do crescimento até 9 h de fermentação, e logo após se estabilizaram.

Com 0 horas de fermentação, o valor médio de viabilidade foi de $5,94 \pm 0,08$ (Log UFC mL⁻¹) (Figura 2). Ao final do processo de fermentação (24 horas) o valor médio de viabilidade foi de $8,00 \pm 0,08$ (Log UFC mL⁻¹).

As formulações obtiveram viabilidade das estirpes *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 acima da quantidade mínima exigida para que um alimento seja considerado probiótico 10^6 a 10^8 UFC (ŠERTOVIĆ et al., 2019). Casarotti. (2014) investigou o efeito da suplementação de farinha de quinoa no leite fermentado. A farinha manteve os probióticos *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis ssp. lactis* BB-12 acima da dose mínima recomendada que é entre 10^6 e 10^8 UFC/mL, durante 28 dias de armazenamento. Chen et al., 2018 avaliou o efeito da adição de farinha de grão de bico (1%, 2%, 3% ou 5%) no iogurte. Os resultados mostraram que a adição de farinha de grão-de-bico proporcionou um maior crescimento de bactérias durante a fermentação.

Segundo Ma et al., (2016) os nutrientes que auxiliam o *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum* ST-III, *L. plantarum* WCFS1 e *L. plantarum* LPHS) a realizar o processo de fermentação no o leite são os aminoácidos isoleucina, leucina, valina, tirosina, metionina e fenilalanina, e a adenina. As contagens viáveis de *L. plantarum* no leite fermentado suplementado com 0,1 g/L de adenina e 0,2 g/L de aminoácidos foram 8,34 e 9,18 UFC/g em 24 e 48 h de fermentação comparado ao controle 7,65 e 7,59 UFC/g em 24 e 48 h, respectivamente.

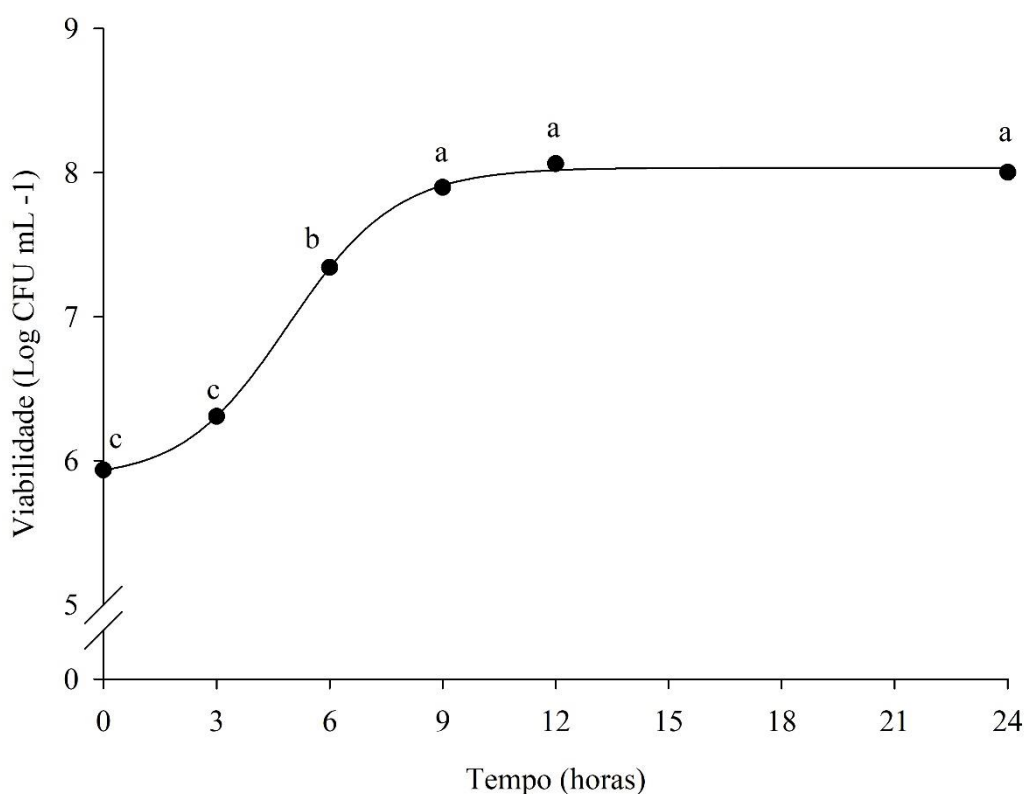


Figura 2 Viabilidade (Log UFC mL⁻¹) das bactérias *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas), independente da adição ou não de farinha de grão-de-bico. Letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott-Knott.

3.1.4 Fenólicos Totais

A concentração de fenólicos totais (μmol de ácido gálico /L de leite) das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 por período de 24 horas, podem ser observados na Figura 3 A e B, Tabela 2.

As formulações controle (FC1 e FC2) (Figura 3 A) demonstraram comportamento semelhante, onde, ambas se mantiveram estáveis durante o processo de fermentação. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do processo fermentativo. Inicialmente, com 0 horas de fermentação as formulações controles sem a adição de farinha de grão-de-bico (FC1 e FC2) apresentaram média de teor de fenólicos totais de $680,25 \pm 29,49 \mu\text{mol}$ de ácido gálico /L de leite. Com 24 horas de fermentação, as mesmas formulações apresentaram média de teor de fenólicos totais de $619,91 \pm 32,98 \mu\text{mol}$ de ácido gálico /L de leite.

As formulações com a adição da farinha de grão-de-bico (FT1 e FT2) (Figura 3 A), apresentaram tendência de declínio durante o processo de fermentação. Diferenças significativas ($P > 0,05$) foram observadas ao longo do processo fermentativo. Inicialmente, com 0 horas de fermentação as formulações com a adição de farinha de grão-de-bico (FT1 e FT2) apresentaram média de teor de fenólicos totais de $1180,25 \pm 112,29 \mu\text{mol}$ de ácido gálico /L de leite. Com 24 horas de fermentação, as mesmas formulações apresentaram média de teor de fenólicos totais de $892,24 \pm 37,14 \mu\text{mol}$ de ácido gálico /L de leite.

As formulações FT1 e FT2 (Figura 3 B) apresentaram teores de fenólicos totais significativamente maiores ($P > 0,05$) ($965,69 \pm 24,51$ e $997,17 \pm 33,86 \mu\text{mol}$ de ácido gálico /L de leite, respectivamente) quando comparadas as formulações FC1 e FC2 ($623,76 \pm 16,69$

e $689,25 \pm 34,60$ μmol de ácido gálico /L de leite, respectivamente), independentemente do tempo de fermentação.

De acordo com Faridy et al., (2020); Zhu et al., (2023) o grão-de-bico contém quantidades significativas de polifenóis, flavonoides, isoflavonas, carotenoides e fenólicos. Também possuem biochanin A e formononetina (isoflavonas). A tendência de queda (Figura 5 A) pode ser explicada pelo fato do *Lactobacillus* consumir os fenólicos presentes na farinha de grão-de-bico, para garantir seu crescimento (ZHU et al., 2023).

Na pesquisa realizada por Zhu et al., (2023) é relatado que a fermentação realizada pela bactéria *Lactobacillus* aumentou a composição de fenólicos do leite de grão-de-bico, resultando em um aumento no teor de fenólicos totais, polifenóis totais e flavonoides totais. Hussein et al., (2020) descreveram em seu trabalho, que a adição de 3% de farinha de grão-de-bico em iogurtes aumentou o teor de fenólicos totais durante a fermentação e armazenamento. Além disso, os autores também relataram que o processo de fermentação melhorou a atividade antioxidante do iogurte adicionado de farinha de grão-de-bico.

MENG et al., (2022) realizaram um estudo, onde os autores acoplaram a hidrólise de proteínas e a fermentação de *Lactobacillus plantarum* para desenvolver bebidas de quinoa. Os autores relataram que o uso combinado de hidrólise de proteínas, juntamente com a fermentação de *L. plantarum*, melhorou significativamente o teor de fenólicos da bebida de quinoa.

A partir dos resultados, nota-se que a adição da farinha de grão-de-bico ao leite fermentado, resultou em teores de fenólicos totais elevados, em relação ao controle. Portanto, observa-se que, a fermentação juntamente com a adição de 4,5 % da farinha de grão-de-bico melhorou os teores de fenólicos do leite fermentados pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou SBR64.7.

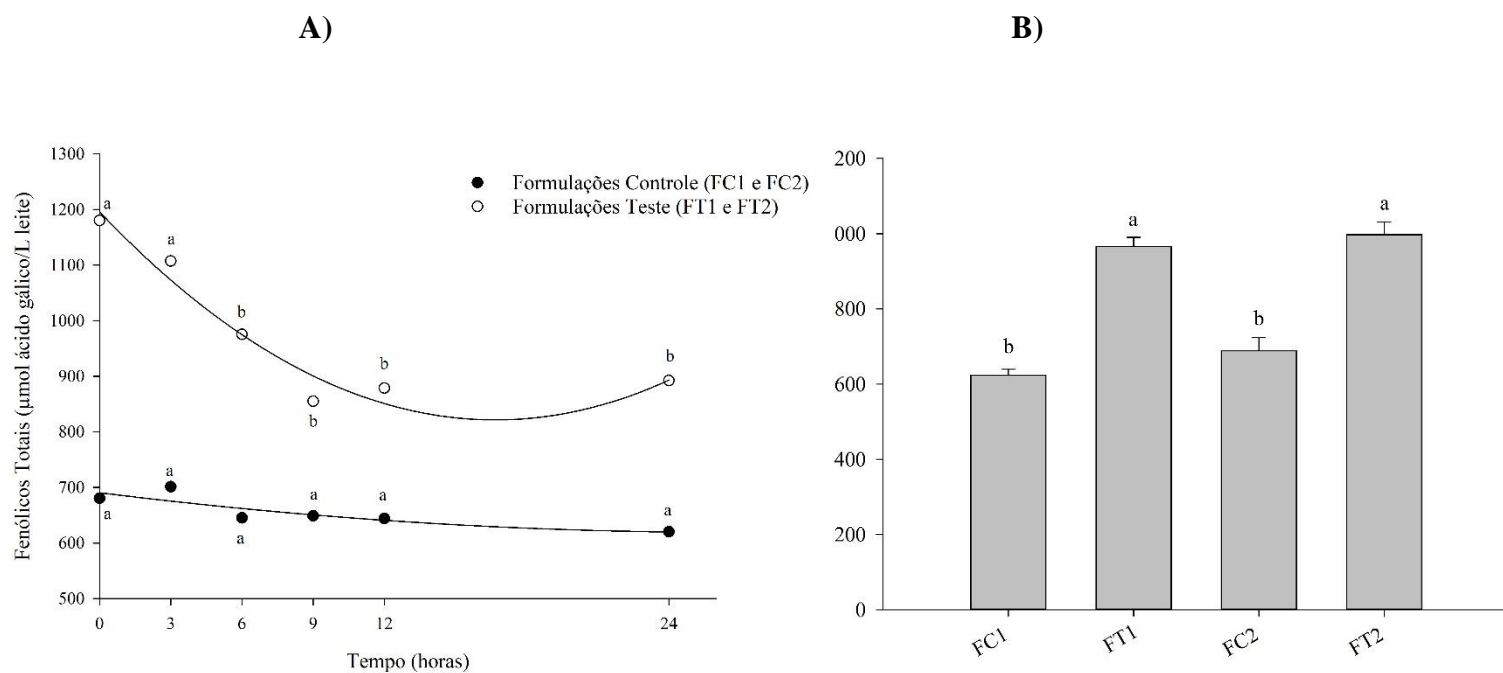


Figura 3 Teor de fenólicos totais das formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas). Valores médios de fenólicos totais das formulações ao longo do tempo de fermentação (A). Concentração de fenólicos totais das diferentes formulações (B). Na figura (A) letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), e na figura (B) letra minúscula representa diferença estatística entre formulações ($P > 0,05$) de acordo com o teste Scott- Knott. (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%).

3.1.5 Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP) e Capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•))

A capacidade antioxidante (µmol TROLOX /L de leite) das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 por período de 24 horas, podem ser observados na Figura 4 A, B e C Tabela 2 (FRAP) e Figura 5 A e B, Tabela 2 (DPPH).

Inicialmente, com 0 horas de fermentação, as formulações FC1 e FT1 (Figura 4 A) apresentaram teores de atividade antioxidante FRAP de $134,08 \pm 21,27$ e $121,99 \pm 19,62$

$\mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite, respectivamente. Ao final da fermentação (24 horas) apresentaram teores de atividade antioxidante de $84,33 \pm 7,34$ e $75,40 \pm 9,35 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite, respectivamente. Houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de fermentação em ambas as formulações, no qual apresentaram tendência de declínio nos teores de atividade antioxidante.

As formulações FC2 e FT2 (Figura 4 B), com 0 horas de fermentação apresentaram teores de atividade antioxidante FRAP de $122,70 \pm 18,54$ e $115,41 \pm 12,67 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite, respectivamente. Ao final da fermentação (24 horas) apresentaram teores de atividade antioxidante de $99,14 \pm 3,86$ e $93,09 \pm 10,27 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite, respectivamente. Diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de fermentação, com tendência de declínio foram observadas na formulação FT2, entretanto que a formulação FC2 se manteve estável e não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do processo de fermentação.

Foi observado diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as formulações, independentemente do tempo de fermentação (Figura 4 C). As formulações FC1 e FT1 apresentaram diferenças significativas, onde a formulação FC1 apresentou atividade antioxidante FRAP significativamente maior ($P > 0,05$) ($101,20 \pm 5,92 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite), comparada a formulação FT1 ($85,84 \pm 5,52 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite). Já as formulações FC2 e FT2 não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$).

A queda na capacidade antioxidante (FRAP) durante a fermentação ocorre devido ao *Lactobacillus* utilizar os fenólicos como fonte de energia para garantir seu crescimento e manter-se viável. A formulação FT1 (Figura 4 C) apresentou capacidade antioxidante significativamente menor ($P > 0,05$), comparada a formulação FT2. Essa queda ocorre devido ao *Lactobacillus* utilizar os fenólicos. O grão-de-bico possui compostos naturais (fenólicos) que atuam como fontes de energia suplementar e possuem atividade antioxidante (HUSSEIN et al., 2020). Considerando que no grão-de-bico são encontrados compostos bioativos, a adição da farinha resultou aumento da capacidade antioxidante da formulação FT2 (ZHU et al., 2023).

Inicialmente, com 0 horas de fermentação, as formulações FC1 e FT1 (Figura 5 A) apresentaram teores de atividade antioxidante DPPH de $2,49 \pm 0,26$ e $1,64 \pm 0,45 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite, respectivamente, ao final da fermentação, com 24 horas apresentaram teores de atividade antioxidante de $1,37 \pm 0,12$ e $2,17 \pm 0,37 \mu\text{mol TROLOX /L}$ de leite,

respectivamente. Houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de fermentação na formulação FC1, no qual foi observada tendência de declínio nos teores de atividade antioxidante. A formulação FT1 se manteve estável, sem diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de fermentação. Com 3 e 24 horas de fermentação (figura 5 A), a formulação FT1 apresentou teores de atividade antioxidante ($2,70 \pm 0,56$ e $2,17 \pm 0,37$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$) significativamente maiores ($P > 0,05$), comparada a formulação FC1 ($1,14 \pm 0,34$ e $1,37 \pm 0,12$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$).

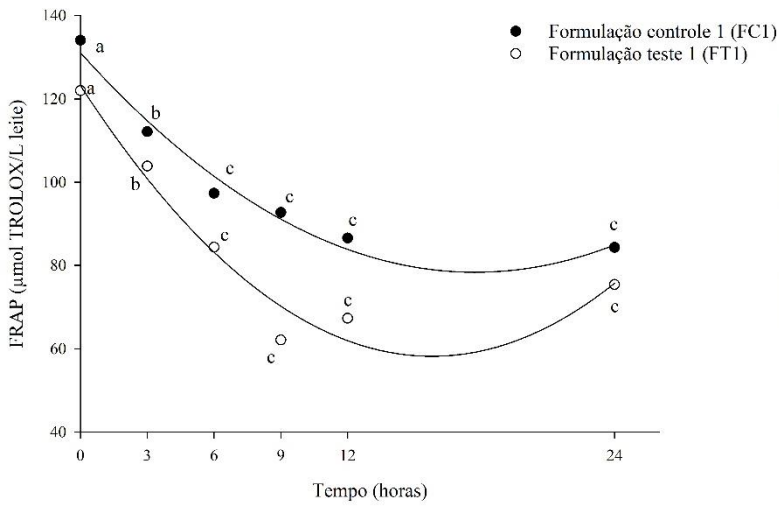
As formulações FC2 e FT2 (Figura 5 B) com 0 horas de fermentação, apresentaram teores de atividade antioxidante DPPH de $1,77 \pm 0,32$ e $2,24 \pm 0,14$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$, respectivamente, ao final da fermentação, com 24 horas apresentaram teores de atividade antioxidante de $2,11 \pm 0,43$ e $1,29 \pm 0,69$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$, respectivamente. Houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de fermentação em ambas formulações. Com 3 e 24 horas de fermentação (figura 5 B), a formulação FC2 apresentou teores de atividade antioxidante ($2,57 \pm 0,36$ e $2,11 \pm 0,43$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$) significativamente maiores ($P > 0,05$), quando comparada a formulação FT2 ($1,35 \pm 0,51$ e $1,29 \pm 0,69$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$). Com 12 horas de fermentação (figura 5 B), a formulação FT2 apresentou teor de atividade antioxidante ($2,51 \pm 0,20$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$) significativamente maior ($P > 0,05$), comparada a formulação FC2 ($0,96 \pm 0,56$ $\mu\text{mol TROLOX /L de leite}$).

Pereira et al. (2018) mencionam que durante a fermentação, as bactérias probióticas podem degradar e tornar biodisponíveis algumas moléculas funcionais, incluindo antioxidantes, enzimas, ácidos graxos de cadeia curta, peptídeos, vitaminas e minerais. Essas moléculas podem ser utilizadas pela bactéria para se manter viável durante o processo de fermentação. Esse estudo explica o fato da formulação FT1 apresentar teor significativamente menor ($P > 0,05$) de capacidade antioxidante FRAP em relação à formulação FT2 (Figura 4 C). Possivelmente a bactéria da FT1 consumiu uma quantidade maior de compostos antioxidantes durante a fermentação.

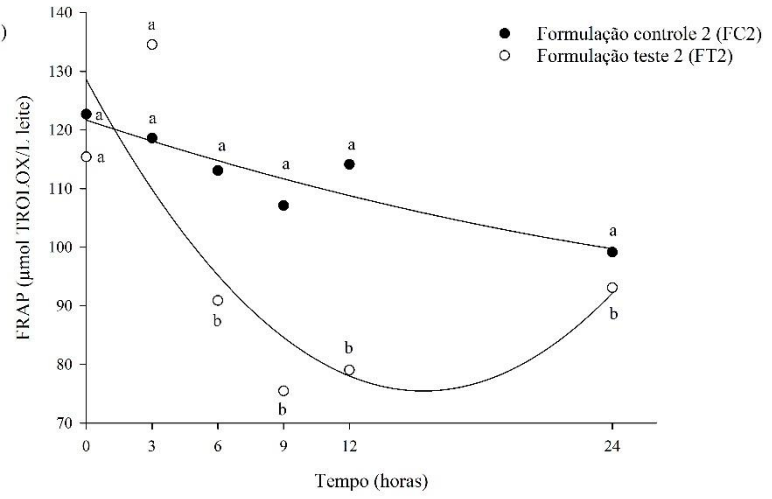
As diferenças entre as análises FRAP e DPPH podem estar relacionadas às diferenças na reatividade de vários antioxidantes e nas reações químicas de cada um dos ensaios. O método FRAP consiste na capacidade de reduzir complexo tripiridiltriiazina férrico (Fe (III) - TPTZ) em complexo ferroso azul (Fe (II) -TPTZ) por meio da doação de elétrons, medindo assim a redução do ferro férrico íon. O método DPPH• consiste na eliminação do 1,1-difenil-

2-picrilhidrazil livre radical medindo-se assim, a capacidade de neutralização radical dos antioxidantes (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

A



B



C

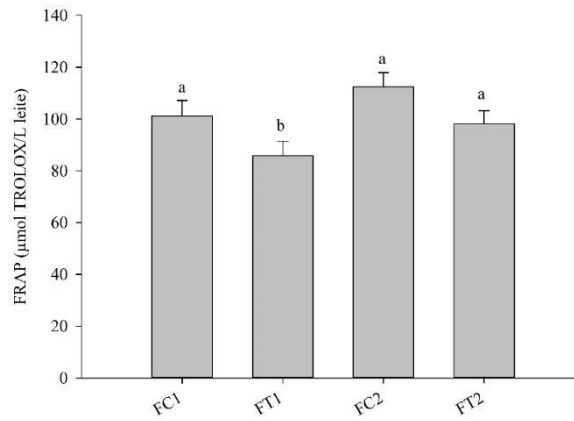


Figura 4 Atividade antioxidante determinada pelo ensaio FRAP nas formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas). Comportamento das formulações FC1 e FT1 (A), FC2 e FT2 (B) ao longo do tempo de fermentação. Valores de atividade antioxidante das diferentes formulações (C). Na figura (A e B) letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), e na figura (C) letra minúscula representa diferença estatística entre formulações ($P > 0,05$) de acordo com o teste Scott-Knott. (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%).

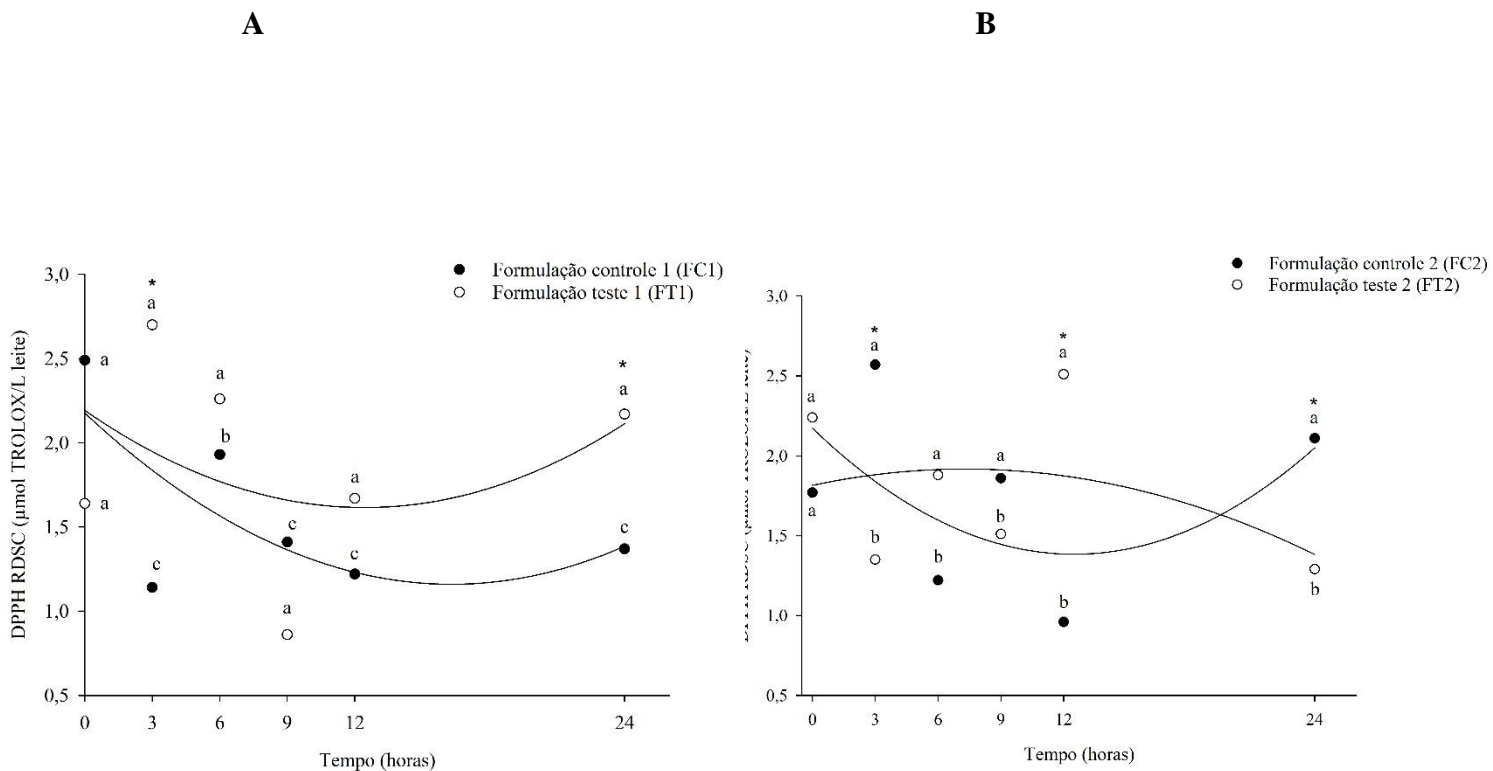


Figura 5 Atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH nas formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 ao longo do tempo de fermentação (0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas). Comportamento das formulações FC1 e FT1 (A), FC2 e FT2 (B) ao longo do tempo de fermentação. *Diferenças estatísticas ($P > 0,05$) comparando formulação controle contra formulação teste com adição de farinha. Letra minúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott. (FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%).

3.2 Determinação da composição química centesimal das formulações

Os teores de umidade, lipídios, carboidratos, cinzas, proteínas e fibra bruta das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7, podem ser observados na Tabela 3. O teor de umidade das formulações FC1 ($83,19 \pm 0,02$ %) e FC2 ($83,04 \pm 0,09$ %) foram significativamente maiores ($P > 0,05$) em relação as formulações FT1 ($80,84 \pm 0,05$ %) e FT2 ($80,24 \pm 0,01$ %). Resultado similar foi obtido para o teor de lipídios, no qual as formulações FC1 ($2,26 \pm 0,04$ %) e FC2 ($1,95 \pm 0,27$ %) foram significativamente maiores ($P > 0,05$) em relação as formulações FT1 ($0,85 \pm 0,07$ %) e FT2 ($1,37 \pm 0,10$ %).

O teor de carboidratos das formulações FT1 ($14,13 \pm 0,44$ %) e FT2 ($14,48 \pm 0,61$ %) foram significativamente maiores ($P > 0,05$) em relação as formulações FC1 ($10,46 \pm 0,58$ %) e FC2 ($11,40 \pm 0,23$ %). Resultado semelhante foi apresentado na análise de cinzas, onde os das formulações FT1 ($0,87 \pm 0,01$ %) e FT2 ($0,89 \pm 0,02$ %) foram significativamente maiores ($P > 0,05$) em relação as formulações FC1 ($0,75 \pm 0,01$ %) e FC2 ($0,77 \pm 0,01$ %). O teor de proteína das formulações foi de $3,34 \pm 0,56$ a $2,84 \pm 0,01$ e não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$). Teores de proteína encontrados no leite de vaca ($3,39$ g/100 g), assemelham-se aos encontrados neste estudo (KATTAN, 2011). O teor de fibra não foi detectado.

Devido ao grão-de-bico possuir em sua composição carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos), houve o aumento dos nos teores de SST, que consequentemente levou a uma redução nos valores de umidade das formulações com a

adição da farinha de grão-de-bico. Ainda, por o grão de bico ser fonte de carboidratos, os teores deste componente foram maiores nas formulações com a adição da farinha de grão-de-bico, O mesmo comportamento foi observado nos teores de cinzas, onde as formulações com a adição da farinha de grão-de-bico demonstraram teores maiores devido ao grão-de-bico ser rico em minerais (potássio, cálcio, ferro e zinco). Já os lipídios das formulações com a adição da farinha de grão-de-bico apresentaram teores menores, isso ocorre em função do aumento de carboidratos quando adiciona-se a farinha de grão-de-bico (HUSSEIN et al., 2020; FERNANDES et al., 2022; RACHWA-ROSIK, 2015; MARGIER et al., 2018).

Tabela 3 Composição centesimal das formulações (%).

Formulações	Análises					
	Umidade (%)	Proteína (%)	Lipídio (%)	Carboidrato (%)	Fibra (%)	Cinzas (%)
FC1	83,19 ± 0,02 a	3,34 ± 0,56 a	2,26 ± 0,04 a	10,46 ± 0,58 b	_____	0,75 ± 0,01 b
FT1	80,84 ± 0,05 c	3,29 ± 0,47 a	0,85 ± 0,07 d	14,13 ± 0,44 a	_____	0,87 ± 0,01 a
FC2	83,04 ± 0,09 b	2,84 ± 0,01 a	1,95 ± 0,27 b	11,40 ± 0,23 b	_____	0,77 ± 0,01 b
FT2	80,24 ± 0,01 d	3,02 ± 0,61 a	1,37 ± 0,10 c	14,48 ± 0,61 a	_____	0,89 ± 0,02 a

(FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). Letra minúscula representa diferença estatística entre formulações ($P > 0,05$) de acordo com o teste Scott- Knott.

3.3 Caracterização físico-química e microbiológicas das formulações durante armazenamento refrigerado a 4°C.

3.3.1 pH e Acidez titulável.

Os valores de pH e a acidez titulável das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7, e armazenadas por 28 dias podem ser observados na Tabela 4. Declínio nos valores de pH foram observados em todas as formulações, durante todo o período de armazenamento (28 dias). Enquanto, os valores de acidez titulável apresentaram aumento em todas as formulações, durante todo o período de armazenamento (28 dias) (Tabela 4).

As formulações FT1 e FT2, apresentaram valores de pH significativamente menores ($P > 0,05$) em relação as formulações FC1 e FC2 nos dias 14, 21 e 28 de armazenamento. O pH e acidez titulável são inversamente proporcionais, à medida que o pH diminuiu, os valores de acidez titulável (g/100 g de ácido láctico) aumentaram (apenas a partir do 14º dia). Valores mais elevados de acidez titulável foram apresentados pelas formulações FT1 e FT2, apresentando assim, valores significativamente maiores ($P > 0,05$) em relação as formulações FC1 e FC2 durante o 14º, 21º e 28º dias de armazenamento.

Em um estudo realizado por Mani- López, Palou, e López-Malo (2014) foi observado aumento da quantidade de ácido láctico em iogurte durante armazenamento a 5°C por 35 dias. Casarotti et al., (2018) relataram que houve aumento da acidez titulável em bebidas de aveia e arroz fermentadas por *L. casei* Lc-1 e *S. thermophilus* TA040 durante estocagem refrigerada 4°C por 28 dias. Decréscimo no pH durante o armazenamento também foi observado na elaboração de iogurte probiótico suplementado com fibras de limão e de laranja, onde, após 30 dias de estocagem a 4 °C, os valores de pH dos eram de 3,97 e 3,92, respectivamente (SENDRA et al., 2008).

Senadeera et al., (2018)., produziram um iogurte probiótico adicionado de polpas de várias espécies de *Annona* e observaram suas características físico-químicas por um período de 28 dias de armazenamento. Houve uma maior diminuição do pH e aumento da acidez titulável durante o armazenamento nas amostras com a adição da polpa, em relação ao controle. Os autores explicam que esse fato ocorre devido a disponibilidade de carboidratos das frutas. A adição de polpa de fruto também aumentou a atividade antioxidante dos iogurtes.

HUSSEIN et al., (2020) avaliaram o efeito da adição do grão-de-bico em iogurte. O valor de pH das amostras sem a adição de grão-de-bico foi maior, comparando-se as amostras com o grão-de-bico. Durante o armazenamento (21 dias a 4°C), houve declínio no pH e aumento na acidez titulável de todas as amostras. Os autores explicam que a acidez aumenta devido á fermentação da lactose pelas BALs. O mesmo comportamento foi observado neste trabalho, onde os valores de pH das formulações sem a adição de farinha de grão-de-bico (FC1 e FC2) foram maiores.

3.3.2 Sólidos Solúveis Totais

Os valores de SST (°Brix) das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7, e armazenadas por 28 dias podem ser observados na Tabela 4. No 21º dia de armazenamento, as formulações FT1 ($16,17 \pm 0,21$ °Brix) e FT2 ($16,40 \pm 0,26$ °Brix) apresentaram valores significativamente menores ($P > 0,05$) em relação às formulações FC1 ($17,27 \pm 0,12$ °Brix) e FC2 ($17,80 \pm 0,10$ °Brix).

Os sólidos solúveis totais são substâncias que podem ser dissolvidas em água. O decréscimo dos SST pode estar relacionado a reações químicas que ocorrem durante a fermentação e o armazenamento (BECKLES, 2012). Observa-se que, durante o período de estocagem refrigerada, o crescimento do micro-organismo ocorreu de forma mais lenta, o que resultou em uma estabilidade dos SST neste período.

3.3.3 Viabilidade

Os valores de viabilidade das estirpes *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas formulações fermentadas, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico e armazenadas por 28 dias, podem ser observados na Tabela 4. Ao observar a viabilidade das estirpes *L. plantarum* S 180.7 e *L. plantarum* SBR 64.7 durante 28 dias de armazenamento a 4°C, nota-se que houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as formulações, entretanto não houve diferenças significativas durante período de armazenamento. As formulações FT1 e FT2 apresentaram viabilidade acima de 8,0 log UFC/mL, significativamente maior ($P > 0,05$), quando comparadas as formulações FC1 e FC2 que apresentaram viabilidade acima de 7,0 log UFC/mL significativamente menor ($P > 0,05$).

Resultados semelhantes puderam ser vistos no iogurte de soja fermentado por *L. rhamnosus* K4E e *L. helveticus* K14, onde a viabilidade foi semelhante (8,68 Log UFC/mL) no 10º dia de armazenamento (MISHRA et al. 2019). No leite a presença de aminoácidos livres e bastante limitada, é necessário que as BALs realizem a hidrólise da proteína para terem fonte de carbono. Entretanto o grão-de-bico é rico em arginina livre, que é utilizada como substrato pelas BALs para realizarem a fermentação. Devido ao grão-de-bico possuir aminoácidos livres (arginina, ácido glutâmico, ácido aspártico, leucina e triptofano) a suplementação com a farinha de grão-de-bico foi capaz de proporcionar um crescimento mais acelerado das BALs (BINTSIS, 2018; CORTÉS-GIRALDO et al., 2016).

Chen et al. (2018) relataram que os prebióticos, como galacto-oligossacarídeo (GOS) existentes no grão-de-bico, favoreceram o crescimento do *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* YOMIX 883. Skrzypczak et al. (2019) relataram que durante a fermentação, as proteínas presentes em leguminosas também podem ser hidrolisadas por enzimas proteolíticas dos microrganismos, tornando-se biodisponíveis. É possível que as estirpes *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 tenha exercido atividade proteolítica, o que favoreceu sua viabilidade e crescimento nas formulações. O fato da estirpe *L. plantarum* SBR64.7 ser de origem vegetal (silagem) pode explicar sua facilidade em degradar a proteína vegetal.

Souza et al. (2013) avaliaram o comportamento microbiológico, físico-químico e sensorial do leite fermentado com *L. plantarum* BG112 durante 70 dias de armazenamento. A contagem de *L. plantarum* BG112 variou de 10,1 a 8,9 log UFC mL⁻¹, no início e final do armazenamento, sua viabilidade ficou acima do mínimo exigido para possuir alegações de propriedades funcionais e para que possa ser caracterizado como alimento probiótico. Os autores concluíram que, o *L. plantarum* BG112 apresentou ótima viabilidade em leite fermentado, e que por mais que não seja considerado probiótico pela legislação brasileira, as estirpes de *L. plantarum* são bastante promissoras na produção de alimentos com propriedades funcionais.

Ao analisar o efeito do grão de bico em um bio-iogurte, utilizando as culturas probióticas (*Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 e uma mistura de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* e *Lactobacillus acidophilus* (SACOO Lyofast (AB1)) a farinha de grão-de-bico estimulou o crescimento dos probióticos, a contagem bacteriana foi de 8,28 Log, 8,12 Log, 8,04 Log e 7,32 Log UFC/g com 3, 2, 1% de farinha de grão de bico e controle, respectivamente, aos 21 dias de armazenamento (HUSSEIN et al., 2020).

A suplementação de farinha de quinoa no leite fermentado resultou em uma população maior de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis ssp. lactis* BB-12 em comparação com o tratamento controle aos 28 dias de armazenamento (CASAROTTI, 2014). Hussein et al., (2020) afirmaram em seu trabalho que os polissacarídeos encontrados na ervilha (também no grão-de-bico) aumentaram o crescimento das bactérias probióticas no iogurte. Portanto, nota-se o grão-de-bico foi importante para manter a viabilidade dos potenciais probióticos.

Tabela 4 pH, acidez titulável (g/100 g de ácido láctico), sólidos solúveis totais (°Brix) e viabilidade (Log UFC mL⁻¹) das formulações ao longo do armazenamento.

Análises	Formulações	Tempo de armazenamento (dias)				
		0	7	14	21	28
pH	FC1	5,68 ± 0,06 aA	5,27 ± 0,04 aB	5,39 ± 0,01 aC	5,19 ± 0,03 aD	5,14 ± 0,04 aD
	FT1	4,75 ± 0,05 aA	4,00 ± 0,03 aB	3,75 ± 0,04 bC	3,71 ± 0,01 bC	3,33 ± 0,04 bD
	FC2	5,76 ± 0,04 aA	5,27 ± 0,06 aC	5,61 ± 0,03 aB	5,30 ± 0,04 aC	5,29 ± 0,03 aC
	FT2	4,76 ± 0,04 aA	4,10 ± 0,05 aB	3,92 ± 0,03 bC	3,95 ± 0,02 bC	3,68 ± 0,03 bD
Acidez Titulável	FC1	0,24 ± 0,00 aD	0,26 ± 0,00 aC	0,29 ± 0,01 bB	0,30 ± 0,01 bB	0,31 ± 0,00 bA
	FT1	0,44 ± 0,02 aE	0,54 ± 0,01 aD	0,65 ± 0,01 aC	0,71 ± 0,01 aB	0,74 ± 0,02 aA
	FC2	0,23 ± 0,00 aD	0,25 ± 0,01 aC	0,27 ± 0,01 bB	0,29 ± 0,01 bA	0,29 ± 0,01 bA
	FT2	0,44 ± 0,01 aE	0,50 ± 0,00 aD	0,58 ± 0,01 aC	0,63 ± 0,02 aB	0,68 ± 0,02 aA
Sólidos Solúveis Totais	FC1	17,90 ± 0,35 aA	17,33 ± 0,70 aA	16,63 ± 0,15 aA	17,27 ± 0,12 aA	17,50 ± 0,50 aA
	FT1	17,00 ± 0,36 aA	17,33 ± 0,15 aA	16,37 ± 0,35 aB	16,17 ± 0,21 bB	16,63 ± 0,57 aB
	FC2	18,23 ± 0,60 aA	17,87 ± 0,23 aA	17,37 ± 0,31 aA	17,80 ± 0,10 aA	17,63 ± 0,46 aA
	FT2	17,60 ± 0,46 aA	17,10 ± 0,17 aB	16,80 ± 0,00 aC	16,40 ± 0,26 bC	16,47 ± 0,12 aC
Viabilidade	FC1	8,34 ± 0,32 aA	7,76 ± 0,22 bB	7,85 ± 0,12 bB	7,79 ± 0,04 bB	7,96 ± 0,01 bB
	FT1	8,56 ± 0,04 aA	8,49 ± 0,05 aA	8,62 ± 0,06 aA	8,49 ± 0,08 aA	8,51 ± 0,08 aA
	FC2	7,66 ± 0,04 bA	7,59 ± 0,08 bA	7,77 ± 0,16 bA	7,54 ± 0,11 bA	7,65 ± 0,03 bA
	FT2	8,47 ± 0,11 aA	8,31 ± 0,05 aA	8,43 ± 0,07 aA	8,36 ± 0,07 aA	8,39 ± 0,02 aA

(FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). Letra minúscula representa diferença estatística entre formulações em um mesmo tempo de fermentação ($P > 0,05$) e letra maiúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott.

3.3.4 Estabilidade física e capacidade de retenção de água

Os valores de estabilidade física e capacidade de retenção de água das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR 64.7, e armazenadas por 28 dias podem ser observados na Tabela 5.

Ao observar os valores de estabilidade física, no 28º dia de armazenamento a 4°C (Tabela 5), nota-se que as formulações FT1 e FT2 apresentaram valores significativamente

menores de liberação de água ($P > 0,05$), em relação as formulações FC1 e FC2. Indicando que estas formulações FT1 e FT2 mantiveram-se mais estáveis durante o armazenamento com menor liberação de água. O mesmo comportamento foi observado na análise de capacidade de retenção de água (Tabela 5), onde no 28º dia de armazenamento a 4°C, as formulações FT1 e FT2 apresentaram valores significativamente maiores ($P > 0,05$) em relação as formulações FC1 e FC2. Indicando que estas formulações FT1 e FT2 reteram maior quantidade de água.

A sinérese é um fenômeno relacionado à firmeza do produto, que deve ser adequada, de modo a evitar a separação do soro (PENNA, 1994). O grão-de-bico é fonte de polissacarídeos e oligossacarídeos, estes compostos apresentam propriedades capazes de reter moléculas de água e também possuem função de agentes espessantes e gelificantes (HUSSEIN et al., 2020). Resultados semelhantes foram descritos por Ozcan, (2017), onde a adição de farinha de castanha reduziu os valores de sinérese ao longo do armazenamento. Isso ocorreu devido os oligossacarídeos possuírem alta ligação com molécula de água e, conseqüentemente, capacidade de redução da água livre.

Vogado et al., (2018) descreveram em seu trabalho que a polpa de banana verde, foi responsável por diminuir a sinérese do leite fermentado, devido seu alto teor de carboidratos. Os autores ressaltam que em produtos lácteos, como leites fermentados independentemente da adição de fontes de amido, a sinérese pode ser observada durante o armazenamento refrigerado, isso acontece devido a acidez e mudanças na ligação às proteínas. Entretanto, no atual trabalho houve diminuição da sinérese, ou seja, as formulações com adição de farinha de grão-de-bico (FT1 e FT2) ficaram mais estáveis no 28º dia de armazenamento

Tabela 5 Estabilidade física (mL) e capacidade de retenção de água (%) das formulações ao longo do armazenamento.

Formulações	Análises			
	Estabilidade física (mL)		Capacidade de retenção de água (%)	
	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	28	0	28
FC1	0,29 ± 0,05 aB	0,58 ± 0,05 aA	4,06 ± 2,35 aA	3,57 ± 1,34 bA
FT1	0,09 ± 0,00 aA	0,12 ± 0,05 bA	27,50 ± 4,53 aB	57,89 ± 1,88 aA
FC2	0,18 ± 0,00 aB	0,58 ± 0,05 aA	7,74 ± 1,53 aA	2,10 ± 0,44 bB
FT2	0,09 ± 0,00 aB	0,27 ± 0,00 bA	20,63 ± 8,21 aB	50,15 ± 4,19 aA

(FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). Letra minúscula representa diferença estatística entre formulações em um mesmo tempo de fermentação ($P > 0,05$) e letra maiúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott.

3.3.5 Fenólicos Totais

A concentração de fenólicos totais das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 e armazenadas por período de 28 dias, podem ser observados na Tabela 6.

As formulações com a adição de farinha de grão-de-bico (FT1 e FT2) (Tabela 6) apresentaram teores de fenólicos totais significativamente maiores ($P > 0,05$) nos dias 0 e 28 de armazenamento. Todas as formulações mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento (0 e 28 dias) e não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo. Durante os dias 0 e 28 de armazenamento as formulações FT1 ($1171,80 \pm 184,19$ e $1118,47 \pm 97,00$ μmol de ácido gálico /L de leite, respectivamente) e FT2 ($1274,02 \pm 100,19$ e $1202,91 \pm 56,39$ μmol de ácido gálico /L de leite, respectivamente) apresentaram médias significativamente maiores ($P > 0,05$) quando comparadas as formulações FC1 ($809,13 \pm 25,62$ e $718,13 \pm 88,30$ μmol de ácido gálico /L de leite, respectivamente) e FC2 ($828,47 \pm 52,12$ e $850,69 \pm 56,49$ μmol de ácido gálico /L de leite, respectivamente).

Em um estudo feito por Senadeera et al., (2018), foi observado que a adição de polpas de várias espécies de *Annona* ao iogurte probiótico por um período de 28 dias de armazenamento, aumentou significativamente a atividade antioxidante do iogurte, que apresentou maiores atividades antioxidantes no primeiro dia de armazenamento em relação ao controle (SENADEERA et al., 2018).

Em seu estudo, Abdel-Hamid et al. (2020) realizaram uma suplementação do iogurte com extrato da fruta *Siraitia grosvenorii* (0,5%, 1% e 2%) e, puderam verificar que o iogurte probiótico com 2% de extrato da fruta apresentou as maiores atividades antioxidantes. De acordo com o trabalho realizado por Hussein et al., (2020) a adição de 3% de farinha de grão-de-bico em bio-iogurte foi capaz de elevar e o crescimento de bactérias probióticas e aumentar a capacidade antioxidante.

Zhu et al., 2023 relata em seu estudo que a fermentação por *Lactobacillus* provocou quebra da estrutura da parede celular do grão-de-bico, assim ocasionando liberação de compostos fenólicos. Esse estudo explica o fato dos tratamentos com a adição de farinha de grão-de-bico apresentarem maiores quantidades de fenólicos totais durante o armazenamento. A adição da farinha de grão-de-bico ocasionou teores elevados de fenólicos totais, devido ao grão-de-bico possuir fenólicos em sua composição. Apesar das formulações não apresentarem diferenças ao longo do tempo, houve diferença no mesmo período de tempo entre as formulações.

3.3.6 Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP) e capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•))

A capacidade antioxidante das formulações, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, fermentadas pelas estirpes *L. plantarum* S180.7 ou *L. plantarum* SBR64.7 e armazenadas por período de 28 dias, podem ser observados na Tabela 6.

Os valores de capacidade de redução férrica (FRAP) não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as formulações (Tabela 6). Entretanto, foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento. As formulações FC1 e FC2 apresentaram valores de capacidade de redução férrica significativamente menores ($P > 0,05$) no 28º dia de armazenamento. O mesmo comportamento de queda foi observado na

formulação FT2. Enquanto, a formulação FT1 se manteve estável e não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento.

Inicialmente, com 0 dias de armazenamento a formulação FC2 apresentou teor de atividade antioxidante (DPPH) ($2,52 \pm 0,12 \mu\text{mol TROLOX /L de leite}$), significativamente maior ($P > 0,05$), comparado a formulação FT2 ($1,36 \pm 0,16 \mu\text{mol TROLOX /L de leite}$). As formulações FC1 e FT1 não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). No 28º dia de armazenamento, a formulação FC1 apresentou atividade antioxidante ($2,83 \pm 0,42 \mu\text{mol TROLOX /L de leite}$), significativamente maior ($P > 0,05$), comparado a formulação FT1 ($1,49 \pm 0,30 \mu\text{mol TROLOX /L de leite}$). As formulações FC2 e FT2 não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). As formulações FT1 e FT2 mantiveram-se estáveis durante o período de armazenamento (0 e 28 dias) e não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo. A formulação FC1 apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento, com valor de atividade antioxidante significativamente maior ($P > 0,05$) no 28º dia de armazenamento. Enquanto a formulação FC2 apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento, com valor de atividade antioxidante significativamente menor ($P > 0,05$) no 28º dia de armazenamento.

Parte dos fenólicos estão presentes na matriz da parede celular, juntamente com macromoléculas (pectina, celulose e proteínas estruturais) que são mais difíceis de serem utilizadas pelos microrganismos do que os fenólicos livres. O processo de fermentação é responsável por melhorar a biodisponibilidade dessas substâncias, assim maximizando o potencial antioxidante. Algumas cepas de *Lactobacillus* são capazes biotransformar substratos vegetais, assim aumentando o conteúdo de fenólicos, ao mesmo tempo que degradam proteínas em aminoácidos (ZHU et al., 2023).

Zhang et al., (2022) observou que o *L. plantarum* conseguiu realizar a liberação de flavonoides e fenólicos durante a fermentação a partir da produção de enzimas ou ácidos, assim aumentando a capacidade antioxidante do leite de grão-de-bico. Em seu trabalho, Bontsidis et al., 2021 relatam que a fermentação realizada pela bactéria lática *Lactobacillus Paracasei* aumentou os teores de fenólicos totais.

A hidrólise dos componentes presentes no grão-de-bico durante a fermentação, faz com que as bactérias probióticas degradem tornem biodisponíveis algumas moléculas funcionais, como por exemplo, antioxidantes, enzimas, ácidos graxos de cadeia curta e

peptídeos. Estes por sua vez, serão utilizados por essa mesma bactéria para garantir seu crescimento e manter-se viável (PEREIRA et al., 2018; BONTSIDIS et al., 2021). Esse estudo explica o fato da formulação FC2 apresentar teor de atividade antioxidante significativamente maior ($P > 0,05$), comparado a formulação FT2, com 0 dias de armazenamento. Já com 28 dias de armazenamento, a formulação FC1 apresentou teor de atividade antioxidante, significativamente maior ($P > 0,05$), comparado a formulação FT1. A hipótese para As formulações com a adição de 4,5 % de farinha de grão-de-bico apresentem menor atividade antioxidante, pode ser explicada por ambas tornarem biodisponíveis algumas moléculas funcionais presentes no grão-de-bico, consumindo-as para se manterem viável..

Tabela 6 Teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante FRAP e DPPH das formulações ao longo do armazenamento.

Análises	Formulações	Tempo de armazenamento (dias)	
		0	28
Fenólicos Totais (μmol ácido gálico/L leite)	FC1	809,13 \pm 25,62 bA	718,13 \pm 88,30 bA
	FT1	1171,80 \pm 184,19 aA	1118,47 \pm 97,00 aA
	FC2	828,47 \pm 52,12 bA	850,69 \pm 56,49 bA
	FT2	1274,02 \pm 100,19 aA	1202,91 \pm 56,39 aA
FRAP (μmol TROLOX/L leite)	FC1	120,49 \pm 11,31 aA	82,73 \pm 11,63 aB
	FT1	102,42 \pm 8,63 aA	93,60 \pm 6,56 aA
	FC2	137,63 \pm 6,35 aA	108,02 \pm 4,77 aB
	FT2	114,78 \pm 6,49 aA	102,28 \pm 0,91 aB
DPPH RDSC (μmol TROLOX/L leite)	FC1	1,43 \pm 0,27 bB	2,83 \pm 0,42 aA
	FT1	1,76 \pm 0,51 bA	1,49 \pm 0,30 bA
	FC2	2,52 \pm 0,12 aA	2,09 \pm 0,20 bB
	FT2	1,36 \pm 0,16 bA	1,54 \pm 0,54 bA

(FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). Letra minúscula representa diferença estatística entre formulações em um mesmo tempo de fermentação ($P > 0,05$) e letra maiúscula representa diferença estatística ao longo do tempo ($P > 0,05$), de acordo com o teste Scott- Knott.

3.4 Sobrevivência de *L. plantarum* S180.7 e SBR64.7 nas formulações, após exposição *in vitro* às condições simuladas do trato gastrointestinal

Os valores de sobrevivência das estirpes *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 nas formulações fermentadas, adicionadas ou não de 4,5 % de farinha de grão-de-bico, podem ser observados na Tabela 7.

Observou-se que as formulações FC1, FT1, FC2 e FT2 não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando expostos a diferentes condições simuladas *in vitro*. Portanto, a adição de farinha de grão-de-bico não influenciou a sobrevivência dos potenciais probióticos *L. Plantarum* S180.7 e SBR 64.7.

As matrizes lácteas, incluindo o leite fermentado são carreadoras e auxiliam na proteção dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, nota-se, que as formulações apresentaram sobrevivência dos potenciais probióticos *L. Plantarum* S180.7 e SBR64.7 superior a 90%. O leite devido à sua quantidade de gordura, é capaz proteger os probióticos das condições adversas enfrentadas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (KHORSHIDIANA, 2020).

Li et al. (2017) realizaram um estudo sobre a influência do *L. plantarum* IMAU80106, IMAU10216 e IMAU70095 nas propriedades de fermentação do iogurte e concluíram que o leite fermentado é uma excelente matriz carreadora para o crescimento de *L. plantarum* IMAU80106, IMAU10216 e IMAU70095. Os autores concluíram que as contagens de probióticos mantiveram-se viáveis e acima da dose mínima recomendada (pelo menos 10^6 UFC/g).

Araújo et al., (2010) ao desenvolverem um queijo cottage simbiótico contendo *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 observaram boa sobrevivência as condições simuladas do TGI (baixos valores de pH e a altas concentrações de sais biliares) das bactérias probióticas. Além disso, algumas estirpes de bactérias lácticas possuem mecanismos de defesa que são ativados durante a passagem pelo TGI. Entre eles estão: bomba de prótons, produção de substâncias alcalinas no citoplasma, alterações na membrana celular e proteção de macromoléculas.

Tabela 7 Sobrevivência de *L. plantarum* S180.7 e *L. plantarum* SBR64.7 após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal.

Análises	Formulações	Tratamentos		
		Suco Gástrico	Suco Pancreático	Sucessivo
Sobrevivência (%)	FC1	94,70 ± 2,10 a	96,23 ± 2,91 a	96,05 ± 1,40 a
	FT1	96,80 ± 0,79 a	98,45 ± 1,06 a	97,32 ± 0,44 a
	FC2	96,44 ± 0,93 a	97,29 ± 0,65 a	96,13 ± 2,49 a
	FT2	98,90 ± 0,85 a	98,98 ± 0,57 a	98,33 ± 1,16 a

(FC1): leite desnatado reconstituído (LDR) + sacarose + *L. plantarum* S180.7; (FT1): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* S180.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%); (FC2): (LDR) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7; (FT2): LDR (95,5%) + sacarose + *L. plantarum* SBR64.7 + farinha de grão-de-bico (4,5%). Letra minúscula representa diferença estatística entre formulações ($P > 0.05$), de acordo com o teste Scott- Knott.

Conclusão

A farinha de grão-de-bico aumentou a viabilidade dos potenciais probióticos *Lactobacillus plantarum* S180.7 e *Lactobacillus plantarum* SBR64.7, mantendo-os viáveis durante 28 dias de armazenamento. Embora sejam necessários testes *in vivo*, do ponto de vista da contagem obtida, essas estirpes possuem alto potencial para serem consideradas probióticas. A adição da farinha de grão-de-bico torna o leite fermentado um alimento com alto poder antioxidante e maior teor de fenólicos, tornando-o um produto com alto potencial de promoção a saúde.

O aumento da viabilidade dos potenciais probióticos *Lactobacillus plantarum* S180.7 e *Lactobacillus plantarum* SBR64.7 e o consequente aumento da vida de prateleira do leite fermentado, pode ser considerado um benefício de suma importância para o processo industrial, bem como, para o consumidor final, com o aumento dos nutrientes e compostos bioativos.

Referencias

ABDEL-HAMID, M. et al. Bioactive properties of probiotic set-yogurt supplemented with *Siraitia grosvenorii* fruit extract. **Food Chemistry**. 303, 2020.

ACKER, L., BERGNER, K.-G., DIEMAIR, W., HEIMANN, W., KIERMEIER, F., SCHORMÜLLER, J., SOUCI, S. W.: Handbuch der Lebensmittelchemie, Band II/2, Analytik der Lebensmittel, Nachweis und Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen, S. 331, **Springer Verlag** (1967).

AGUILERA, Y. et al. Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) as Affected by a Dehydration Process. p. 187–195, 2011.

ALMEIDA, M. H. B. et al. Potentially probiotic açai yogurt. **Society of Dairy Technology**. v. 61, n. 2, p. 178-182, 2008.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. AOCS. Approved procedure am 5-04 rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. 2005.

AYIVI, R. D. et al. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. **Dairy**. p. 202-232, 2020

BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, n.1, p. 135–142, 2013.

BECKLES, D. M. Fatores que afetam os sólidos solúveis pós-colheita e o teor de açúcar da fruta do tomate (*Solanum lycopersicum* L.). **Biologia e Tecnologia Pós-colheita**, 63, 129-140, 2012.

BELL, V; FERRÃO, J; FERNANDES, T. Nutritional Guidelines and Fermented Food Frameworks. **Foods**. v. 6, s.p., 2017.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BONTSIDIS, C. et al. Microbiological and chemical properties of chokeberry juice Fermented by new lactic acid bacteria with potential Probiotic properties during fermentation at 4 °C for 4 weeks. **Foods**, p. 1–16, 2021.

CALABUIG-JIMÉNEZ, L., BETORET, E., BETORET, N., PATRIGNANI, F., BARRERA, C., SEGUÍ, L., ... DALLA ROSA, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius spp. salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and in vitro digestion. **Journal of Food Engineering**, 240, 43–48.

CARNEIRO, T. S. et al. Avaliação da farinha de banana verde com aplicação de antioxidantes. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 28634–28643, 2020.

CARREZ, M.C.: Annales de chimie analytique 14,187–189 (1909).

CASAROTTI, S. N. et al. Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, n. July, p. 69–76, 2018.

COMAN, M. M. et al. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and their combination SYN BIO®, in synbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 2, p. 261–268, 2013.

CORTÉS-GIRALDO, I. et al. Purification of free arginine from chickpea seeds (*Cicer arietinum*). **Food Chemistry**, v. 192, p. 114–118, 2016.

COSTA, R. J. et al. Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. **Journal of Food Quality**. 2019.

CHEN, X. et al. Yogurt Fortification with Chickpea (*Cicer arietinum*) Flour: Physicochemical and Sensory Effects. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 1041–1048, 2018.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429–7436, 2006.

DAVOODI, S. et al. Influence of sucrose, glucose, stevia leaf and stevioside on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*. **Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science**, v. 40, n. 4, p. 275–279, 2016.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland. 2002.

FARIDY, J. M. et al. Biological Activities of Chickpea in Human Health (*Cicer arietinum* L). **A Review**. 2020.

FERNANDES, T. C. R. et al. Technological characterization of BRS cristalino variety chickpea flour. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, p. 1–8, 2022.

GONÇALVES, A. et al. Elaboração de massa alimentícia fresca a partir das farinhas de banana da terra (*Musa sapientum*) e aveia (*Avena sativa*). **Scientific Electronic Archives**, v. 15, n. 4, 2022.

GUZMAN-GONZALEZ, M., MORAIS, F., RAMOS, M., & AMIGO, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat settype yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79(8), 1117 e 1122.

HAMEED, A. M. et al. Amino Acids, Solubility, Bulk Density and Water Holding Capacity of Novel Freeze-Dried Cow's Skimmed Milk Fermented with Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* Bu-Eg5 and *Lactobacillus rhamnosus* Bu-Eg6. **Arabian Journal of Chemistry**, 2021.

HANG, F. et al. Preliminary study for the stimulation effect of plant-based meals on pure culture *Lactobacillus plantarum* growth and acidification in milk fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, 2020.

HUSSEIN, H. et al. Impact of chickpea as prebiotic, antioxidant and thickener agent of stirred bio-yoghurt. **Annals of Agricultural Sciences**, p. 0–1, 2020.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KATTAN, JD, COCCO, RR E JÄRVINEN, KM. Alergia ao leite e soja. *Clínicas Pediátricas da América do Norte*, 58(2), 407–426, 2011.

KHORSHIDIANA, Nasim; YOUSEFIA, Mojtaba; MORTAZAVIANB, A, M. Fermented milk: The most popular probiotic food carrier. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 94, p. 91-114, 2020.

LI, C. et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during post fermentation storage. **American Dairy Science Association**, p. 2512-2525, 2017.

LIU, Yen-Wenn; LIONG, Min- Tze; TSAI, Ying-Chieh. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 601–613, 2018.

LUNARDI, A. et al. Non Starter Lactic acid bacteria (NSLAB): A challenge to the cheese industry. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021.

LIANG, Z. et al. Effects of probiotics on biogenic amines content in fermented milk during fermentation and storage. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 127, n. August 2023, p. 105985, 2024.

MA, C. et al. Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. **LWT - Food Science and Technology**, p. 884-889, 2016.

MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2578–2590, 2014.

MARGIER, M. et al. Nutritional composition and bioactive content of legumes: Characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2018.

MENG, F. B. et al. The combined effect of protein hydrolysis and *Lactobacillus plantarum* fermentation on antioxidant activity and metabolomic profiles of quinoa beverage. **Food Research International**, v. 157, n. May, p. 111-416, 2022.

MESQUITA, M. C; LEANDRO, E. S; DE ALENCAR, E. R; BOTELHO, R. B. A. Fermentação de bebidas de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e coco (*Coccus nucifera* L.) por *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* LBC 81: A influência do teor de açúcar no crescimento e estabilidade durante o armazenamento. **LWT - Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 132, 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITES FERMENTADOS. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007.

MISHRA, B. K. et al. Biofunctional attributes and storage study of soy milk fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus helveticus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 399–407, 2019.

NATH, S. et al. In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. **Food Quality and Safety**, v. 4, p. 213–223, 2020.

NORBERTO, AP, MARMENTINI, RP, CARVALHO, PH, CAMPAGNOLLO, FB, TAKEDA, HH, ALBERTE, TM. Impacto da substituição parcial e total do leite por extrato hidrossolúvel de soja nos parâmetros de fermentação e crescimento de microrganismos do kefir. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 93 (março), 491–498, 2018.

OLIVEIRA, C. P; SILVA, J. A. Leite Fermentado Probiótico E Suas Implicações Na Saúde. **Revista Verde De Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde De Agricultura Alternativa**. v. 6, n. 3, p. 25–31, 2011.

ORTAKCI, F. et al. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6274–6281, 2012.

OZCAN, T.; ARZU, L. Y.; DELIKANLI, A. B. Antioxidant properties of probiotic fermented milk supplemented with chestnut flour (*Castanea sativa* Mill) . p. 1–9, 2017.

PENNA, A. L. B. Uso de soro desmineralizado em pó na fabricação de iogurte. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and

criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2060–2076, 2018.

PEREIRA, M. T; SANTANA, E. H. W; SANTOS, J. S. Importance of Lactic Acid and Non Starter Bacteria (NSLAB) in Dairy Derivatives Production Technology. **Ensaíos**. v. 24, n. 4, p. 348-352, 2020.

PITINO, I. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiol**, v.31, p. 57–63, 2012.

RACHWA-ROSIK, D.; NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Chickpeas. Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1135–1143, 2015.

SENADEERA, S. S. et al. Antioxidant, physicochemical, microbiological, and sensory properties of probiotic yoghurt incorporated with various *Annona* species pulp. **Heliyon**. v. 4, 2018.

SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiol**. v. 25, p. 13–21, 2008.

ŠERTOVIĆ, E. et al. Physical, Chemical, Microbiological and Sensory Characteristics of a Probiotic Beverage Produced from Different Mixture of Cow's Milk and Soy Beverage by *Lactobacillus acidophilus* La5 and Yogurt Culture. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 4, 2019.

SILVA, E.; MIRANDA, M. Cinética da fermentação de leite adicionado de Farinha de Banana Verde na produção de iogurte. **Research, Society and Development** v. 9, n. 8, p. 1–13, 2020.

SILVA, H. R. et al. Technological applications of lactic acid bacteria (bals) in milk products. **Revista Ingi**. v. 4, n. 1, p. 681-690, 2020.

SILVA, L. G; LOPES, D. S; BASTOS, P. A. M. B. Caracterização de bactérias ácido lácticas autóctones de Bom Jesus do Itabapoana/RJ: ação antagonista contra *Listeria monocytogenes* e provas bioquímicas. **Essentia Editora Iffluminense**. v. 24, n. 1, p. 194-208, 2022.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.** v.16, p. 144-158, 1965.

SOUZA, A. H. P. et al. Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of the milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. Acta Scientiarum. **Ciências da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 125-131, 2013.

SUNANLIGANON, C.; THONG-NGAM, D.; TUMWASORN, S. et al. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits Helicobacter pylori growth and attenuates gastric inflammation. World J. Gastroenterol, v.18, p.2472-2480, 2012.

SKRZYPCZAK, K. et al. Reinforcement of the antioxidative properties of chickpea beverages through fermentation carried out by probiotic strain *lactobacillus plantarum* 299v. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2019.

TODOROV, S. V.; MELO FRANCO, B. D. G. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. **Food Ver. Int**, v.26, p.205–229, 2010.

VOGADO, C. DE O. et al. Enrichment of probiotic fermented milk with green banana pulp: Characterization microbiological, physicochemical and sensory. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 427, 2018.

ZAABOUL, F., RAZA, H., CAO, C., & YUANFA, L. The impact of roasting, high pressure homogenization and sterilization on peanut milk and its oil bodies. *Food Chemistry*, 280, 270–277, 2019.

ZARE, F., BOYE, JI, ORSAT, V., CHAMPAGNE, C., & SIMPSON, BK. Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. **Pesquisa Alimentar Internacional**, 44, 2482e2488, 2011.

ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**. p. 103-123, 2020.

ZHU, M. X. et al. Lactobacillus fermentation improved the nutrient value and hypoglycemic activity of chickpea milk. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 35, n. 3, p. 242–250, 2023.

ZHANG, P. et al. Evaluating the effect of lactic acid bacteria fermentation on the quality, aroma and metabolites of chickpea milk. p. 1–13, 2022.