

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Luma Moura Brito

**EFEITO DO USO DE ULTRASSOM NA VIABILIDADE DAS CULTURAS
TRADICIONAIS DO IOGURTE E CULTURAS PROBIÓTICAS**

Belo Horizonte
2022

Luma Moura Brito

**EFEITO DO USO DE ULTRASSOM NA VIABILIDADE DAS CULTURAS
TRADICIONAIS DO IOGURTE E CULTURAS PROBIÓTICAS**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Inayara Cristina Alves Lacerda.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Verônica Ortiz Alvarenga.

Belo Horizonte

2022

B862e Brito, Luma Moura.
Efeito do uso de ultrassom na viabilidade das culturas tradicionais do iogurte e culturas probióticas [recurso eletrônico] / Luma Moura Brito. – 2022.

1 recurso eletrônico (123 f. : il.) : pdf

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.
Coorientadora: Verônica Ortiz Alvarenga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Microbiologia de alimentos – Teses. 2. Alimentos – Modelos matemáticos – Teses. 3. Ultrassom – Teses. 4. Ondas ultrassônicas – Teses. 5. Probióticos – Teses. 6. Iogurte – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Alvarenga, Verônica Ortiz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:664.6

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DO USO DE ULTRASSOM NA VIABILIDADE DAS CULTURAS TRADICIONAIS DO IOGURTE E CULTURAS PROBIÓTICAS

LUMA MOURA BRITO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 28 de junho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (Orientadora e presidente da comissão) - UFMG
Profa. Dra. Verônica Ortiz Alvarenga (Coorientadora) - UFMG
Profa. Dra. Bruna Maria Salotti de Souza - UFMG
Prof. Dr. Eric Keven Silva - Universidade Federal de Alfenas

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Eric Keven Silva, Usuário Externo**, em 01/07/2022, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Maria Salotti de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 04/07/2022, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veronica Ortiz Alvarenga, Professora do Magistério Superior**, em 04/07/2022, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Inayara Cristina Alves Lacerda, Membro de comissão**, em 04/07/2022, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?



[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **1566205** e o código CRC **CC007EE3**.

*Dedico este trabalho ao meu marido,
a demais familiares, a amigos e às
orientadoras pelo apoio incondicional.
Eu amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os recursos para viver, trabalhar, desfrutar de todas as experiências que vivi até aqui e por toda sua bênção.

Em cada momento de desespero, desânimo, loucura, alegria você esteve ao meu lado e eu sempre pensei em como poderia expressar aqui nestas palavras a minha gratidão por você, meu amor. É impossível descrever, registrar, porque este sentimento transborda as formas físicas de expressão. Saiba que minha gratidão é de todo meu coração e com este muito obrigada registrado neste agradecimento a você, Paulo César Rodrigues Junior, o meu amado marido.

Agradeço grandemente às minhas avós Lenice e Branca a força transmitida pelas suas orações e o carinho que sempre tiveram comigo, também ao meu querido vovô Milton, aqui na terra e Valdir, lá do céu, o amor transmitido a mim. Aos meus pais, externo a minha gratidão por todo cuidado e exemplo de determinação e honestidade de vocês.

Aos tios Wagner, Milton, a Cléa, a Juliane, a Silas, a Marlene, a Stefânia, a Fred, a Raquel e a Joanes, Josa, a Maranice, Cleunice e a Eunice; aos primos Luan, Viviane, Ediane, Rose, Aline, Amanda, Letícia, Ednilton, Lauren, Bruna, Ingrid e Peterson; aos cunhados Ana Paula e Pedro; aos sogros Paulo, D. Bela e Bia agradeço o carinho de vocês durante toda a minha trajetória.

À Verônica e à Ina obrigada por terem me acolhido tão bem, me dado todo suporte e cuidado para atravessar uma pandemia, sem deixar de cumprir nosso projeto inicial. Vocês acreditaram em mim, uma desconhecida para vocês, quando eu mesmo descreditei. Foram verdadeiras orientadoras, com muitos ensinamentos, paciência e respeito. A minha admiração e gratidão por vocês crescem em curva exponencial a cada troca que temos.

Ao primo Alex Fabiani de Brito Torres que se dispôs a me ajudar a fazer toda a correção da redação da minha dissertação. Você é extraordinário! À Carla pelo incentivo e carinho!

Ao meu amigo desde a graduação Vinícius, que carinhosamente me apresentou ao programa de pós graduação e não poupou esforços para me auxiliar em tudo de que eu precisasse. À Bianca todos ensinamentos. A sua ajuda desde o início foi essencial, minha amiga!!

Aos IC's queridos Pedro e Giovanna o enorme suporte em minhas análises. Vocês foram incríveis. Aos estimados colegas Renata, Ana Luíza, Dani, Elaine e Amanda todo

incentivo e apoio. Aos técnicos dos laboratórios, em especial à Elaine, Lud, Dhione e Maju por todo o suporte e apoio.

Ao professor Leandro o empréstimo da tecnologia essencial ao meu projeto, bem como às suas orientandas Michelle e Pâmela, que sempre foram muito atenciosas comigo.

Aos meus amigos Arielle, Roberta, Narja, Dani, Rô, Gabi, Nelsinho, Ludy, Igor, Márcia, Sabrina, Damiana, Raquel, Léo, Sr. Guigui, Val, Gracinha, que, mesmo de longe, e estão sempre me enviando carinho e força.

Na minha trajetória final do mestrado eu fui agraciada em poder trabalhar no Centro de Inovação e Tecnologia do SENAI com três mulheres inspiradoras, acolhedoras e detentoras de um conhecimento gigante sobre Engenharia de Alimentos, que me permitiram conciliar esta etapa com o trabalho: Érika, Cecília e Morgana, muito obrigada!

À Universidade Federal de Minas Gerais, aos seus colaboradores, ao Programa de Pós-Graduação aos e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos os conhecimentos compartilhados e à CNPq pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Bruna M. Salotti de Souza e Eric Keven Silva por terem aceito o convite para a participação na banca de defesa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente com minha trajetória durante o Mestrado, muito obrigada!

*“Você não percebeu que você é o único
representante do seu sonho na face da terra
Se isso não fizer você correr, eu não sei o que vai,
então levanta e anda”*

Emicida

RESUMO

Tecnologias emergentes como o Ultrassom de Alta Intensidade (*High-Intensity Ultrasound* - HIUS) têm sido aplicadas em alimentos para além de se atingir efeitos como a inativação microbiana, mas também, em níveis subletais, para causar modificações no processo fermentativo de micro-organismos, como as Bactérias Ácido Láticas (BAL) e otimizar suas atividades metabólicas. Para se ter este efeito é preciso se compreender os fatores que podem impactar na proporção tratamento HIUS em diferentes produtos, como as propriedades físicas, biológicas ou morfológicas de cada micro-organismo, bem como os parâmetros de processo e tipo de matriz alimentar. Por isso, este estudo buscou avaliar o efeito do HIUS no tempo de fermentação na viabilidade microbiana dos seguintes Leites Fermentados (LF): iogurte (só com a cultura protossimbiótica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), um leite fermentado contendo somente *Lactobacillus acidophilus* La 5, e um terceiro produto em co-cultura do iogurte mais *Lactobacillus acidophilus* La 5. Três diferentes Densidades Energéticas (DE) foram utilizadas para sonicar cada produto no banho (0,08, 0,26 e 0,08 J.mL⁻¹ no banho e outras três DE de 1600, 640 e 200 J.mL⁻¹ na sonda, em ambos equipamentos com as amostras submersas em um banho de temperatura de 10 e 25°C. Todas as amostras tratadas com o HIUS no banho não apresentaram efeitos significativos entre si e comparadas ao controle. Mas utilizando-se a sonda, o LF só com a cultura do iogurte teve seu tempo de fermentação reduzido com a densidade energética de 640 J.mL⁻¹ enquanto o leite fermentado contendo só *Lactobacillus acidophilus* La 5 com a sonda teve também seu tempo final de fermentação reduzido usando-se a densidade energética de 200 J.mL⁻¹. Já o LF contendo a cultura do iogurte e a cultura probiótica teve seu tempo de fermentação final aumentado nas amostras tratadas com o ultrassom. As temperaturas de aplicação de HIUS não apresentaram diferença entre si, portanto, a temperatura de 25°C seria a mais indicada para o tratamento com DE de 640 J.mL⁻¹ no LF só com a cultura tradicional do iogurte e com DE de 200 J.mL⁻¹ no LF com a cultura tradicional do iogurte e a cultura probiótica, por poupar mais recursos energéticos para se ter uma rede de frio nesta etapa. Assim, a microbiologia preditiva foi utilizada para avaliar o efeito do HIUS no metabolismo das BAL nos leites fermentados, desta vez, utilizando só a sonda e a temperatura de sonicação de 25°C. As amostras que desempenharam maior rapidez na fermentação apresentaram um aumento da taxa de crescimento microbiano, nestes casos pode-se relacionar uma fase LAG (período de adaptação do micro-organismo em horas) também aumentada. Contudo, o leite fermentado contendo a

cultura do iogurte e a cultura probiótica demonstraram concentrações microbianas no início da fermentação menores do que as amostras controle, indicando que o HIUS inativou algumas células, que não conseguiram compensar e se sobressaírem no metabolismo. Portanto, se torna mais interessante aplicar o ultrassom separadamente nos leites fermentados só com culturas tradicionais do iogurte ou só com *Lactobacillus acidophilus* La 5 utilizando as DE de 640 e 200 J.mL⁻¹ respectivamente a 25°C na sonda.

Palavras-chave: densidade energética; sonda; banho ultrassônico; microbiologia preditiva.

ABSTRACT

Emerging technologies such as High-Intensity Ultrasound (HIUS) have been applied to foods, in addition to achieving effects such as microbial inactivation, but also, at sublethal levels, to cause changes in the fermentation process of microorganisms, such as Lactic Acid Bacteria. (BAL) and optimize your metabolic activities. To have this effect, it is necessary to understand the factors that can impact the proportion of HIUS treatment in different products, such as the physical, biological or morphological properties of each microorganism, as well as the process parameters and type of food matrix. Therefore, this study sought to evaluate the effect of HIUS on fermentation time on the microbial viability of the following Fermented Milks (LF): yogurt (only with the protosymbiotic culture of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*), a fermented milk containing only *Lactobacillus acidophilus* La 5, and a third yoghurt co-culture product plus *Lactobacillus acidophilus* La 5. Three different Energy Densities (DE) were used to sonicate each product in the bath (0.08, 0.26 and 0.08 J.mL⁻¹ in the bath and another three DE of 1600, 640 and 200 J.mL⁻¹ in the probe, in both equipment with the samples submerged in a temperature bath of 10 and 25°C. All samples treated with HIUS in the bath did not show significant effects between them and compared to the control. But using the probe, the LF with the yogurt culture alone had its fermentation time reduced with the energy density of 640 J.mL⁻¹ while fermented milk containing only *Lactobacillus acidophilus* La 5 with the probe also had its final fermentation time reduced using the energy density of 200 J.mL⁻¹. The LF containing the yogurt culture and the probiotic culture had its final fermentation time increased in the samples treated with ultrasound. The HIUS application temperatures did not differ, therefore, the temperature of 25°C would be the most indicated for the treatment with DE of 640 J.mL⁻¹ in the LF only with the traditional culture of yogurt and with DE of 200 J.mL⁻¹ in the LF with the culture traditional yogurt and probiotic culture, for saving more energy resources to have a cold chain at this stage. Thus, predictive microbiology was used to evaluate the effect of HIUS on LAB metabolism in fermented milks, this time using only the probe and sonication temperature of 25°C. The samples that performed faster in the fermentation showed an increase in the microbial growth rate, in these cases it can be related to an increased LAG (adaptation period of the microorganism in hours) phase. However, the fermented milk containing the yogurt culture and the probiotic culture showed lower microbial concentrations at the beginning of fermentation than the control samples, indicating that HIUS inactivated some cells, which were unable to compensate and excel in metabolism. Therefore,

it becomes more interesting to apply the ultrasound separately to fermented milks only with traditional yogurt cultures or only with *Lactobacillus Acidophilus* La 5 using the DE of 640 and 200 J.mL⁻¹ respectively at 25°C in the probe.

Keywords: energy density; probe; ultrasonic bath; predictive microbiology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Classificação de leites fermentados.....	23
FIGURA 1.2 Fatores que influenciam a viabilidade da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados.....	32
FIGURA 1.3 Representação esquemática de uma formação de microjato através do colapso de bolhas de cavitação acústica.....	34
FIGURA 1.4 Matrizes alimentares já submetidas ao tratamento de ultrassom.....	35
CAPÍTULO II	
FIGURA 2.1 Fluxograma dos leites fermentados que serão elaborados com e sem a tecnologia HIUS.....	65
FIGURA 2.2 Amostras de formulações de leite fermentado sendo sonicadas por diferentes equipamentos de HIUS.....	66
CAPÍTULO III	
FIGURA 3.1 Fluxograma dos leites fermentados que serão elaborados com e sem a tecnologia HIUS.....	99
FIGURA 3.2 Amostras de formulações de leite fermentado sendo sonicadas por HIUS.....	106
FIGURA 3.4 Monitoramento do pH ao longo da fermentação do LF I.....	105
FIGURA 3.5 Monitoramento do pH ao longo da fermentação do LF II.....	106
FIGURA 3.6 Monitoramento do pH ao longo da fermentação do LF III.....	107
FIGURA 3.7 Modelagem preditiva de <i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> durante período de incubação do LF I à 37°C.....	108
FIGURA 3.8 Modelagem preditiva de <i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 durante período de incubação do LF II à 37°C.....	111
FIGURA 3.9 Modelagem preditiva de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 durante período de incubação do LF II à 37°C.....	112
FIGURA 3.10- Modelagem preditiva de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 durante período de incubação do LF III à 37°C.....	114

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1.1 - Efeito probiótico de diferentes cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	28
TABELA 1.2 - Aplicações de <i>L. acidophilus</i> em alimentos.....	29
TABELA 1.3 - Alterações reológicas e mecânicas em alimentos submetidos ao tratamento de HIUS.....	37
TABELA 1.4 - Alterações no perfil nutricional em alimentos submetidas ao tratamento de HIUS.....	38
TABELA 1.5 - Alterações microbianas em alimentos submetidas ao tratamento de HIUS.....	40
TABELA 1.6 - Parâmetros de ultrassom aplicados em diferentes matrizes alimentícias contendo micro-organismos.....	42

CAPÍTULO II

TABELA 2.1 - Leites Fermentados distribuídos em 3 formulações, de acordo com as culturas adicionadas.....	65
TABELA 2.2 - Parâmetros de ultrassom aplicado em banho ultrassônico em amostras com volume de 40,8 mL.....	67
TABELA 2.3 - Parâmetros de ultrassom aplicado em banho ultrassônico em amostras com volume de 42,4 mL.....	67
TABELA 2.4 - Parâmetros de ultrassom aplicado em banho ultrassônico em amostras com volume de 41,6 mL.....	68
TABELA 2.5 - Parâmetros de ultrassom aplicado com sonotrodo em amostras com volume de 40,8 mL.....	68
TABELA 2.6 - Parâmetros de ultrassom aplicado com sonotrodo em amostras com volume de 42,4 mL.....	69
TABELA 2.7 - Parâmetros de ultrassom aplicado com sonotrodo em amostras com volume de 41,6 mL.....	69
TABELA 2.8 - Tempo gasto para que atingissem pH < 4,60 as amostras de LF I contendo somente cultura tradicional do iogurte.....	73

TABELA 2.9 - Tempo gasto para que atingissem pH < 4,60 as amostras de LF II contendo cultura tradicional do iogurte + probiótica.....	75
TABELA 2.10 - Tempo gasto para que atingissem pH < 4,60 as amostras de LF III, contendo somente cultura probiótica.....	76
TABELA 2.11 - Viabilidade da cultura tradicional do iogurte (<i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>) das amostras de LF I após 28 dias estocado <4°C.....	77
TABELA 2.12 - Viabilidade de bactérias ácido lácticas totais* das amostras de LF II após 28 dias estocado <4°C	79
TABELA 2.13 - Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 das amostras de LF II após 28 dias estocado <4°C.....	80
TABELA 2.14 - Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 das amostras de LF III.....	81
TABELA 2.15 - pH e acidez (g de ácido láctico/100 g) das amostras de LF I após 28 dias estocado <4°C.....	82
TABELA 2.16 - pH e acidez (g de ácido láctico/100 g) das amostras de LF II após 28 dias estocado <4°C	83
TABELA 2.17 - pH e acidez (g de ácido láctico/100 g) das amostras de LF III.....	84

CAPÍTULO III

TABELA 3.1 - Leites fermentados distribuídos em 3 formulações, de acordo com as culturas adicionadas.....	99
TABELA 3.2 - Parâmetros de ultrassom aplicado com sonotrodo em amostras com volume de 40,8 mL.....	101
TABELA 3.3 - Parâmetros de ultrassom aplicado com sonotrodo em amostras com volume de 42,4 mL.....	101
TABELA 3.4 - Parâmetros de ultrassom aplicado com sonotrodo em amostras com volume de 41,6 mL.....	102

TABELA 3.5 - Parâmetros de crescimento da cultura tradicional do iogurte LF I contendo somente cultura tradicional do iogurte.....	109
TABELA 3.6 - Parâmetros de crescimento das BAL no LF II contendo cultura tradicional do iogurte + probiótica.....	111
TABELA 3.7- Parâmetros de crescimento do <i>L. a.</i> LA 5 no LF II contendo cultura tradicional do iogurte + probiótica.....	113
TABELA 3.8 - Parâmetros de crescimento do <i>L. A.</i> LA 5 no LF III contendo somente a probiótica.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ - micro

ANOVA – Análise de Variância

AOAC – Association of Official Analytical Chemist

ATCC - American Type Culture Collection

B.O.D – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BAL - Bactérias Ácido Láticas

BCRC - Bioresource Collection and Research Center

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico

CRA - Capacidade de Retenção de Água

FOS - Frutooligossacarídeos

HIUS - *High-Intensity Ultrasound* - Ultrassom de Alta Intensidade

J - Joule

kHz – Kilohertz

LF - Leites Fermentados

LAG - Período de adaptação do micro-organismo em horas

Log – Logaritmo

LTDA - Limitada

M – Molar

MG - Minas Gerais

min – Minuto

N - normal

OSS - Oligossacarídeos

pH – Potencial hidrogeniônico

s - Segundos

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

US - Ultrassom

W - Watt

×.g - Unidade de vezes a força gravitacional

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	22
OBJETIVOS	24
1.1 Geral	24
1.2 Específicos	24
CAPÍTULO I	25
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1 Leites fermentados	25
1.2 Probióticos	28
1.2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	30
1.2.2 Viabilidade probiótica	33
1.3 Ultrassom de alta intensidade	35
1.3.1 Aplicação de HIUS em alimentos	38
REFERÊNCIAS	48
2 CAPÍTULO II	57
2.1 INTRODUÇÃO	62
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
2.2.1 Material.....	65
2.2.2 Métodos	65
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
2.3.1 Tempo de fermentação	76
2.3.2 Viabilidade microbiana após tempo de estocagem	80
2.3.3 Efeito da estocagem de 28 dias dos leites fermentados no pH e acidez.....	85
2.4 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
3 CAPÍTULO III	94
3.1 INTRODUÇÃO	97
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	99
3.2.1 Material.....	99
3.2.2 Métodos	99
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.3.1 pH durante a fermentação.....	108
3.3.2 Curva e parâmetros da microbiologia preditiva durante a fermentação	111
3.4 CONCLUSÃO	119

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
REFERÊNCIAS	121

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os leites fermentados, o iogurte é considerado o mais popular e a sua aceitação pelos consumidores de diferentes faixas etárias pode ser atribuída a seu expressivo valor nutricional e ao seu sabor característico (ZHANG *et al.*, 2020). O processo fermentativo desse produto ocorre mediante a ação combinada no leite dos micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, sendo o *L. bulgaricus* fundamental para acidificação do meio e o *S. thermophilus* é, principalmente, responsável pelo sabor, pelo aroma e pela textura do iogurte (GU *et al.*, 2020).

A combinação entre a cultura iniciadora do iogurte e culturas de micro-organismos com alegações probióticas pode dar o conceito de alimento funcional a este produto lácteo. Geralmente, Bactérias Ácido Láticas (BAL) específicas do gênero *Lactobacillus* são utilizadas como probióticos em leites fermentados. Embora não seja muito comum realizar a fermentação com apenas uma cultura probiótica, associá-las a outras culturas iniciadoras, como a cultura tradicional de iogurte, é uma possibilidade de compensar essa desvantagem (MITUNIEWICZ-MAŁEK *et al.*, 2017).

Os probióticos são micro-organismos pertencentes a diferentes gêneros e espécies, tanto bactérias como leveduras, que proporcionam benefícios à saúde se consumidos em quantidades e condições adequadas. E para se definir qual cepa probiótica a ser utilizada no produto, é necessário conhecimento sobre a sua característica sensorial, segurança, funcionalidade e capacidade de sobreviver durante a produção e o armazenamento (OLIVEIRA, DENIZE *et al.*, 2017).

A viabilidade dos micro-organismos probióticos pode ser comprometida no processamento e no armazenamento de produtos alimentícios, devido a fatores como acidez, pH, presença de peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, interação com outros micro-organismos e o lento metabolismo de bactérias no processo fermentativo (POTOROKO *et al.*, 2018). Estudos evidenciam alternativas para aumentar a viabilidade probiótica em leites fermentados como imobilização celular, encapsulamento, adição de prebióticos e o uso de tecnologias emergentes, como o ultrassom de alta intensidade (*high-intensity ultrasound* - HIUS).

A aplicação de ultrassom de alta intensidade propicia a formação de um campo acústico que leva a formação e subsequente colapso de microbolhas em um curto intervalo de tempo. Esse fenômeno é conhecido como cavitação acústica. Desta forma, a energia ultrassom pode exercer forças de cisalhamentos, rupturas ou efeitos não destrutíveis, como a sonoporação (KÖRZENDÖRFER *et al.*, 2019).

Nesse sentido, esses efeitos nas células dos micro-organismos podem melhorar a transferência de massa por meio da membrana célula. Além disso, facilitar as reações enzimáticas com o aumento da taxa de transferência de massa dos reagentes para o sítio ativo também contribui para a remoção de subprodutos de células metabolismo e, assim, melhorar o crescimento com a redução do tempo de fermentação (OJHA *et al.*, 2017b).

Além disso, o uso de ultrassom pode aprimorar as características sensoriais, como a capacidade de retenção de água, o perfil de textura e a sinérese de géis de leite fermentados (POTOROKO *et al.*, 2018). O uso de ultrassom de alta intensidade também pode ser aplicado como método alternativo à homogeneização, pois reduz o tamanho de glóbulos de gordura e altera o comportamento reológico do iogurte (SFAKIANAKIS; TOPAKAS; TZIA, 2015).

Aplicando-se ultrassom de alta intensidade no leite antes da inoculação da cultura inicial pode aumentar a capacidade de retenção de água, a viscosidade e diminuir a sinérese. Em contrapartida, o uso do HIUS após a inoculação demonstrou não ter efeito na sinérese, mas ocasionou a redução no tempo de fermentação (OJHA *et al.*, 2017a).

O aprimoramento das características tecnológicas do produto devido a aplicação do HIUS, como os de modulação microbiana ainda requerem mais clareza sobre os mecanismos causados pelo HIUS, que dependem dos tipos de matriz alimentar e dos parâmetros de aplicação (HUANG *et al.*, 2017).

Assim, considerando a escassez de estudos que avaliam o uso de HIUS como uma ferramenta para a melhoria de processos fermentativos em produtos lácteos, esta pesquisa, tem como objetivo avaliar o efeito do HIUS em leites fermentados com a presença de culturas iniciadoras tradicionais do iogurte e probióticos. Além disso, intenta avaliar o efeito de diferentes configurações de equipamentos de ultrassom e parâmetros de processo de sonicação na viabilidade microbiana, considerando a influência desses aspectos na vida útil do produto.

OBJETIVOS

1.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes condições de processo de sonicação e configuração do equipamento de ultrassom sobre a carga microbiana e nas propriedades físico-químicas após a fermentação dos diferentes leites fermentados e com 28 dias de estocagem. Além disso, uma pesquisa utilizando a modelagem preditiva sobre o metabolismo de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em co-cultivo com *L. acidophilus* sob efeito da tecnologia HIUS seria uma oportunidade de trazer mais clareza para quais os melhores parâmetros e condições do desenvolvimento de leites fermentados.

1.2 Específicos

Para atingir esses objetivos, buscou-se;

- i. Avaliar o tempo de fermentação de leite fermentado produzido pela cultura tradicional do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) submetidas ou não ao tratamento de HIUS;
- ii. Avaliar o tempo de fermentação de leite fermentado produzido pela cultura tradicional do iogurte adicionado da cultura probiótica de *L. acidophilus* La-5 submetidas ou não ao tratamento de HIUS;
- iii. Avaliar o tempo de fermentação de leite fermentado produzido somente pela cultura probiótica de *L. acidophilus* La-5 submetida ou não ao tratamento de HIUS;
- iv. Analisar o pH, a acidez e a concentração de bactérias ácido-láticas totais (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* La-5), assim como da cultura probiótica *L. acidophilus* La-5 logo após a fermentação e após 28 dias de armazenamento das formulações de leites fermentados tratadas ou não com HIUS;
- v. Avaliar o desempenho microbiano durante o processo fermentativo de cada formulação, com a modelagem preditiva.
- vi. Utilizar a modelagem preditiva para analisar a interação microbiana durante o processo fermentativo da cultura tradicional do iogurte e da cultura probiótica.
- vii. Avaliar a variação de pH das diferentes formulações submetidas ou não ao tratamento de HIUS durante a cinética microbiana.

CAPÍTULO I

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Leites fermentados

A fermentação se trata de uma da tecnologia milenar e pode ser considerada como um importante método de processamento de alimentos. O precursor da microbiologia moderna, Louis Pasteur, se referiu à técnica como “*La vie sans l'air*”, traduzido como “vida sem ar” (KWOFIE *et al.*, 2020).

A partir de então, a fermentação tem sido definida como o metabolismo de compostos orgânicos por micro-organismos, via aeróbia ou anaeróbia. Mesmo sendo amplamente estabelecida, a fermentação ainda é fonte de estudos, em detrimento do seu potencial de conversão de subprodutos agroindustriais de baixo custo em uma variedade de produtos valiosos, como biomassa microbiana, metabólitos microbianos primários e secundários (PÉREZ-ALVA *et al.*, 2022).

A exemplo desse potencial, tem-se o leite fermentado, cuja origem advém de milhares de anos, através de uma experiência acidental, pode-se observar que a fermentação poderia prolongar a vida útil do leite, a prática se consolidou. Dessa maneira tornou-se um produto de importante papel nutricional na vida moderna e um alimento muito popular na dieta humana (ZHONG *et al.*, 2016).

O leite fermentado é resultado do processo de redução do teor de lactose e pH do leite por meio do metabolismo de culturas microbianas específicas com consequente liberação de metabólitos e coagulação do meio e que conferem ao produto características diferenciadas, maior vida útil, além de um reduzido teor de lactose (SILVA, JAQUELINE FERREIRA, 2019). É um produto que conserva a qualidade nutricional do leite, tal qual possibilita a disposição de uma pluralidade de componentes, como vitaminas resultantes do metabolismo do ácido láctico, enzimas e polipeptídeos (SONG; FU; CHEN, 2021).

Em relação a essa qualidade nutricional, o leite fermentado é fonte de proteína de alta valor biológico, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, niacina, vitamina B12 e riboflavina (PENG, JIANGYING *et al.*, 2022). Os leites fermentados podem ser classificados em iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo ou acidofilado, kumys, kefir e coalhada (**FIG. 1.1**) (BRASIL, 2007).

CAPÍTULO I

Essa classificação vai depender dos micro-organismos que serão adicionados, muitas vezes na forma de culturas *starters*, visto que a microbiota natural do leite pode ser ineficiente, incontrolável ou inativada pelos tratamentos térmicos do leite. Assim, adição de culturas *starters* é uma possibilidade mais segura para se ter uma fermentação controlada e previsível. Em alguns produtos, a diferença da classificação também pode ser baseada nos diferentes tipos de leite e do processo utilizado (NIAMSIRI; BATT, 2009).

FIGURA 1.1 - Classificação de leites fermentados



FONTE: BRASIL (2007), adaptada.

O principal grupo de bactérias utilizadas na fermentação do leite é o das bactérias do ácido láctico (BAL). Nesse caso, o metabolismo envolve desde a produção de grande quantidade de ácido láctico, a formação de biomoléculas livres, como aminoácidos livres, pequenos peptídeos e ácidos graxos à produção de compostos de sabor a partir do metabolismo de carboidratos e citrato, aminoácidos e ácidos graxos (PENG, JIANGYING *et al.*, 2022).

CAPÍTULO I

Durante a fermentação de BAL, as proteases, lipases e β -galactosidases estão envolvidas na liberação enzimática de compostos voláteis responsáveis pelos perfis organolépticos e sensoriais distintos dos produtos lácteos. Além disso, os exopolissacarídeos (EPS) são biomoléculas, também biossintetizadas pelas BAL durante a fermentação, que são capazes de aumentar a viscosidade do produto, melhorando as suas propriedades reológicas, sensoriais e também são capazes de atuar como prebióticos e/ou estimular uma resposta positiva no hospedeiro (AĞAGÜNDÜZ *et al.*, 2022).

A demanda por produtos lácteos aumentou significativamente em muitos países, resultando na instalação de plantas de produção em larga escala. A produção global de leite ficou em aproximadamente 906 milhões de toneladas em 2020, liderada pela Índia, com uma produção de cerca de 196 milhões de toneladas. Na União Europeia, neste mesmo ano, a produção aumentou 1,1% em comparação com 2019 para 160,1 milhões de toneladas (FAO 2020; QUALFOOD 2021; USMANI *et al.*, 2022).

Dentre os produtos lácteos, os leites fermentados são alimentos amplamente consumidos em todo o mundo que têm apresentado um aumento substancial de consumo nos últimos anos. Estima-se que os consumidores geralmente têm uma percepção positiva do iogurte, inclusive no Brasil, a produção de iogurte é a segunda maior no setor alimentício e o seu consumo per capita atualmente é de, aproximadamente, 166,4L/habitante, sendo que as projeções são de crescimento, em função das variedades de segmentação que o iogurte oferece e a sua possibilidade de consumo em qualquer lugar (NIELSEN *et al.*, 2022; STECCA *et al.*, 2020).

Nesse sentido, as tendências do mercado sugerem que esse ainda irá aumentar, devido a um crescente interesse do consumidor nos benefícios nutricionais e de saúde oferecidos por esses produtos, uma vez que seu efeito sobre a microbiota bacteriana do intestino pode contribuir para uma vida saudável e para aumentar a expectativa de vida (GARCÍA-BURGOS *et al.*, 2020).

Principalmente quando as culturas tradicionais são adicionadas de bactérias ácido lácticas com alegação probiótica o iogurte pode contribuir para mudanças na composição da microbiota intestinal comensal, desde que ministradas pela dieta (NIELSEN *et al.*, 2022).

A correlação da microbiota intestinal com alimentos foi analisada pioneiramente pelo Prêmio Nobel Ilya Metchnikoff em 1908, que apontou benefícios de determinados produtos nos micro-organismos intestinais e mecanismos de aprimorar seu metabolismo. Nesse sentido,

CAPÍTULO I

diversos efeitos benéficos podem ser obtidos com o consumo de probióticos e, desde então, a indústria experimenta uma potencial inserção desses ingredientes no mercado de alimentos (LUZ *et al.*, 2021).

Com a crescente necessidade comercial de micro-organismos probióticos na indústria de lácteos, uma grande variedade dessas cepas já está disponível, isoladamente ou em co-culturas. Sobretudo, o sucesso de novos alimentos funcionais depende não apenas do aumento do valor nutricional, como de vitaminas e dos peptídeos ativos, mas também das qualidades sensoriais ideais que atendem às necessidades dos consumidores (LANG *et al.*, 2022).

Apesar da associação de culturas iniciadoras na fermentação possibilitar a produção de alguns compostos de sabor voláteis especiais durante o processo, o metabolismo microbiano, a qualidade do leite fermentado e os graus de parâmetros de acidificação cinética podem ser afetados pela adição de probióticos no sistema de fermentação de co-cultura (LANG *et al.*, 2022; OLIVEIRA, RICARDO P.S. *et al.*, 2009).

1.2 Probióticos

O termo probiótico significa “para vida” e se refere a micro-organismos de diferentes gêneros e espécies, como bactérias e leveduras, que são associados a efeitos benéficos para a saúde humana quando consumidos em condições adequadas (BAGCHI, 2014; LI, HONGBO *et al.*, 2020b).

Atualmente, existem outras denominações de categorias de probióticos, como os paraprobióticos e pós-bióticos, sendo os primeiros células microbianas inativas que, quando administradas em quantidades suficientes, conferem benefícios à saúde dos consumidores, e os pós-bióticos como metabólitos secretados por bactérias vivas ou liberados após a lise celular, que oferecem benefícios fisiológicos para o hospedeiro (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al.*, 2019; KONSTANTINOV *et al.*, 2013).

Os exemplos de pós-bióticos incluem ácidos graxos de cadeia curta, enzimas, peptídeos, ácidos teicóicos, derivados de peptidoglicanos muropeptídeos, endo- e exo-polissacarídeos, proteínas de superfície celular, vitaminas, plasmalogênios e ácidos orgânicos (TSILINGIRI; RESCIGNO, 2013).

A legislação brasileira concebe probióticos como “[...] micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo”. Portanto, os paraprobióticos e pós-bióticos não podem ser incluídos como probióticos (BRASIL, 2018).

CAPÍTULO I

Atualmente, pode-se observar o aumento da alimentação consciente e, com isso, a participação dos alimentos funcionais no mercado progrediu. Os alimentos funcionais não apenas nos fornecem elementos que vão nutrir os consumidores, mas que também vão melhorar aspectos físicos e comportamentais das pessoas, por meio da modulação de várias funções fisiológicas (LIU, ZHENBIN; BHANDARI; ZHANG, 2020).

Dessa forma, os probióticos apresentam-se como uma das classes mais rentáveis e em constante crescimento, com uma projeção global de ganhos por volta de 78,3 bilhões de dólares em 2026 para a categoria de alimentos com alegação de propriedade funcional (DIOSO *et al.*, 2020; OLIVEIRA, Denize *et al.*, 2016). Estima-se que o leite é matriz alimentar em que os probióticos são mais aplicados no mercado de alimentos (LIU, ZHENBIN; BHANDARI; ZHANG, 2020).

Os diversos efeitos benéficos que podem ser obtidos com os probióticos são extremamente interessantes para o desenvolvimento de novos produtos. Os seus mecanismos de ação são abordados na literatura científica por sua eficácia em tratamentos de distúrbios intestinais e sistêmicos, redução da intolerância à lactose, manutenção do nível de colesterol sérico e redução atividade carcinogênica, antimutagênica e anti-hipertensiva. Ademais, alguns micro-organismos probióticos são relacionados à inibição de patógenos (CRUZ *et al.*, 2010; LI, HONGBO *et al.*, 2020a).

Por conseguinte, as alegações probióticas devem ser específicas daquelas que tiveram comprovação de eficácia e baseadas em estudos cuidadosamente realizados e confiáveis, ou seja, os efeitos fisiológicos benéficos devem ser demonstrados por evidências científicas aceitas (CRUZ *et al.*, 2010).

Além disso, os efeitos positivos são específicos de cada cepa apresenta benefícios específicos, e esses não devem ser extrapolados para outra cepa se não forem cientificamente comprovados. Assim, é de suma importância informar a cepa utilizada em produtos probióticos, já que o benefício só pode ser concedido a uma espécie se for comprovado para essa (DE ALMADA *et al.*, 2016; PIMENTEL *et al.*, 2021).

Os leites e derivados, principalmente o leite fermentado, têm sido os veículos mais conhecidos para os probióticos (OLIVEIRA, DENIZE *et al.*, 2016). Grande parte das espécies probióticas utilizadas para a produção de alimentos pertence aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que as mais comuns são *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. infantis* e *B. longum* (CRUZ *et al.*, 2010).

CAPÍTULO I

A exemplo dos efeitos funcionais em produtos lácteos, pode-se observar que o consumo diário de leite fermentado com *L. casei* 431 pode ser uma terapia potencial para aumentar a resposta imune contra os vírus da gripe, especialmente para indivíduos com imunidade relativamente baixa (TRACHOOTHAM *et al.*, 2017). Os ensaios clínicos randomizados em humanos demonstram que o leite fermentado de *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* BB-12 apresentou potencial antidiabético ao diminuir, significativamente, os níveis de TNF- α , resistina e frutossamina em pacientes diabéticos (BAGCHI, 2014; SAKANDAR; ZHANG, 2021).

1.2.1 *Lactobacillus acidophilus*

Um estudo avaliou a taxonomia do gênero *Lactobacillus* com base em sequências genômicas completas compreende 261 espécies que são extremamente diversas nos níveis fenotípico, ecológico e genotípico, os autores propuseram a reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 gêneros (ZHENG *et al.*, 2020).

Cada um desses gêneros pode ser segmentado em espécies, subespécies, variantes e cepas (ANJUM *et al.*, 2014). Uma das espécies do gênero *Lactobacillus* é o conhecido *Lactobacillus acidophilus*, isolado pela primeira vez em 1900 por Moro, a partir de fezes infantis. Contudo ele também pode ser encontrado no trato gastrointestinal humano e na vagina (PARVANEH; MARYAM, 2011).

Trata-se de um micro-organismo Gram-positivo que possui aproximadamente de 2 a 10 μm de tamanho, temperatura e pH ótimo de 30-45°C e de 4 a 5, respectivamente. Também dispõe de uma morfologia de bastonetes, metabolismo anaeróbio, homofermentativo, que pode seguir a glicólise ou a via Embden-Meyerhof-Parnas para fermentar hexoses e produzir d e ℓ -ácido láctico (ANJUM *et al.*, 2014).

O *Lactobacillus acidophilus* é uma cepa probiótica que estimula respostas imunológicas por meio de peptídeos antimicrobianos e produtos orgânicos gerados pelo metabolismo. A **Tabela 1.1** ilustra os diferentes efeitos probióticos das espécies de *Lactobacillus acidophilus*. A cepa de *L. acidophilus* IDCC 3302 foi relatada como estimuladora de respostas biológicas epiteliais, por meio de efeitos antifotodanos da pele (IM *et al.*, 2018; LIM *et al.*, 2020).

CAPÍTULO I

TABELA 1.1- Efeito probiótico de diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*

Cepa	Efeito probiótico	Referência
<i>L. acidophilus</i> IDCC 3302	Prevenção do fotoenvelhecimento da pele e a formação de rugas	(IM <i>et al.</i> , 2018)
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Modulação da microbiota intestinal	(SERGEEV <i>et al.</i> , 2020)
<i>L. acidophilus</i> LA-14	Tratamento de obesidade	(GOMES; HOFFMANN; MOTA, 2020)
<i>L. acidophilus</i> LA-14	Tratamento de artrite reumatoide	(CANNARELLA <i>et al.</i> , 2021)
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Tratamento de pneumonia	(TSILIKA <i>et al.</i> , 2022)
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Tratamento de diabetes mellitus tipo 2	(TONUCCI <i>et al.</i> , 2017)
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Tratamento de diabetes mellitus gestacional	(HAJIFARAJI <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: dados da pesquisa.

Outras implicações benéficas causadas por cepas de *L. acidophilus* foram: a modulação da microbiota intestinal humana com o aumento de espécies microbianas benéficas após uma intervenção de 3 meses com *L. acidophilus* DDS-1 e outras cepas probióticas (SERGEEV *et al.*, 2020). Relatos da aplicação de *L. acidophilus* LA-5 apontam que são causadores da variação na composição filogenética da microbiota intestinal em mulheres obesas e na redução de leucócitos e citocinas inflamatórias em pessoas com artrite reumatoide (CANNARELLA *et al.*, 2021; GOMES; HOFFMANN; MOTA, 2020).

Nesse sentido, o *L. acidophilus* LA-5 apresenta diferentes efeitos na literatura científica, que incluem a redução da incidência de pneumonia associada à ventilação, sepse e tempo de permanência em unidade de terapia intensiva em pacientes multi-traumáticos sujeitos à ventilação mecânica e aumento do controle glicêmico em indivíduos com diabetes mellitus tipo

CAPÍTULO I

2 (TONUCCI *et al.*, 2017; TSILIKA *et al.*, 2022), bem como na melhora de marcadores de estresse oxidativo e inflamação em mulheres com diabetes mellitus gestacional (HAJIFARAJI *et al.*, 2018).

Esses benefícios associados ao *L. acidophilus* podem ser relacionados aos alimentos, visto que essa espécie é aplicável na fermentação de muitas matrizes alimentícias, especialmente em produtos lácteos, quando sua atividade metabólica resulta na produção de sabor e aroma que causam propriedades organolépticas especiais, inibem bactérias deterioradoras de alimentos e também há relatos do efeito antagonista a patógenos (PARVANEH; MARYAM, 2011). Na **Tabela 1.2** há exemplos de aplicação de *L. acidophilus* em diferentes matrizes de alimentos, como suco de fruta, barra de cereais, arroz integral germinado fermentado, pão e iogurtes de leite caprino e bovino.

TABELA 1.2 - Aplicações de *L. acidophilus* em alimentos

Matriz alimentar	Cepa	Referência
Arroz integral germinado fermentado	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1	(LI, SING CHUNG <i>et al.</i> , 2019)
Suco de fruta (laranja e maçã)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	(MARQUES <i>et al.</i> , 2021)
Barra de cereais revestida com chocolate	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA02-ID-1688	(LASTA <i>et al.</i> , 2021)
Pão	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	(HADIDI <i>et al.</i> , 2021)
Iogurtes de leite de cabra e vaca	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	(WANG, CUINA <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: dados da pesquisa.

LI, Sing Chung *et al.*, 2019 demonstraram o potencial probiótico do *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 em exercer efeito preventivo em carcinogênese colorretal em roedores. Porém a maioria dos estudos de aplicação de micro-organismos probióticos em alimentos, como o *L. acidophilus* visa ao aumento da viabilidade desses após o processamento e ao longo do período de *shelf life* dos produtos. MARQUES *et al.*, 2021 realizaram o microencapsulamento do *Lactobacillus acidophilus* La-5 aplicado em suco de laranja e maçã, LASTA *et al.*, 2021 e HADIDI *et al.*, 2021 encapsularam cepas de *L. acidophilus* para adicioná-lo em barra de cereais revestida com chocolate e em pão.

CAPÍTULO I

1.2.2 Viabilidade probiótica

O intuito de promover os benefícios de alimentos probióticos requer que os microorganismos estejam viáveis e adequadamente abundantes no momento do consumo. Contudo, a presença de vários fatores ambientais danosos pode causar problemas na viabilidade dos probióticos (SAKANDAR; ZHANG, 2021).

Outro desafio para os alimentos funcionais contendo probióticos é a perda de viabilidade celular durante o trânsito gastrointestinal, que pode impedir que quantidades adequadas de probióticos cheguem ao intestino ao final da vida de prateleira do produto (LASTA *et al.*, 2021). A matriz alimentar pode aumentar ou também diminuir os efeitos potenciais dos probióticos, logo, deve-se tomar nota da natureza das matrizes alimentares, nas quais os probióticos são veiculados (SAKANDAR; ZHANG, 2021).

Os fatores que podem afetar a viabilidade probiótica são tais como acidez titulável, pH, homogeneização, peróxido de hidrogênio, conteúdo de oxigênio, temperatura de estocagem, tipo de probiótico, grau de inoculação, suplementos de crescimento, associação de espécies ou cepas, concentração de ácido lático e acético, concentração de proteína e o lento metabolismo de bactérias no processo fermentativo (MEYBODI *et al.*, 2020; POTOROKO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, SUN *et al.* investigaram o impacto da temperatura durante a fermentação do leite com as culturas tradicionais do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) e o probiótico *Lactobacillus casei* Zhang. Foi observado que na fermentação a 37°C, a contagem de células probióticas viáveis foi cerca de 3,5 vezes maior que a 42°C, considerada alta temperatura. Logo, isso proporcionou impacto tanto na contagem das BAL após período de armazenamento de 10 dias do produto quanto no perfil sensorial do leite fermentado (SUN *et al.*, 2022).

As mesmas temperaturas foram usadas para comparar a fermentação de kombucha por Kanurić *et al.*, sendo observado que na temperatura de 42°C o consumo de lactose foi mais rápido que a 37°C (KANURIĆ *et al.*, 2018). Além disso, a temperatura também é um fator de impacto durante o armazenamento do produto, visto que pode reduzir a sobrevivência de células viáveis.

A pesquisa de KANG *et al.*, 2012 avaliou diferentes temperaturas na viabilidade do probiótico *Weissella cibaria* em goma de mascar, e observou que após 4 meses a 4°C, a viabilidade da bactéria gram-positiva foi significativamente maior que a 20°C.

CAPÍTULO I

A associação de diferentes espécies durante a fermentação pode afetar também a produção de um alimento contendo probióticos, bem como sua posterior estabilidade, o que afeta a viabilidade das bactérias. Um estudo conduzido por MANI-LÓPEZ *et al.*, 2014 mostrou que, durante a fermentação, a adição de *Lactobacillus acidophilus* pode reduzir o tempo de fermentação de iogurte quando associada as culturas tradicionais (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*), enquanto que com *L. casei* esse período pode ser dobrado na associação das 3 espécies.

Entretanto, na ausência de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, foi detectado menor alteração de pH durante o armazenamento. A contagem dessa BAL foi reduzida nos iogurtes fermentados com diferentes espécies probióticas. Por fim, foi demonstrado que a pós acidificação durante o armazenamento depende da BAL presente (MANI-LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2014).

Nesse sentido, além do pH, a composição da matriz que veicula probióticos em um produto é de grande importância na sua viabilidade. DE OLIVEIRA *et al.* estudou a possibilidade de usar suco de cenoura e manga como veículo a bactérias das espécies *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. acidophilus*. Devido às condições, a última espécie apresentou baixo desenvolvimento devido ao pH, nível de oxigênio e composição química do meio (DE OLIVEIRA, PATRÍCIA MARTINS *et al.*, 2021).

Com isso, matriz alimentar na qual o probiótico é veiculado pode constituir uma escolha crucial na viabilidade das células. Castro *et al.* observou que BAL produziram diferentes quantidades de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em função à matriz a qual estavam vinculados. Em comparação ao mel, o leite mostrou efeito protetor ao estresse oxidativo a culturas de *Lactobacillus* (CASTRO *et al.*, 2021).

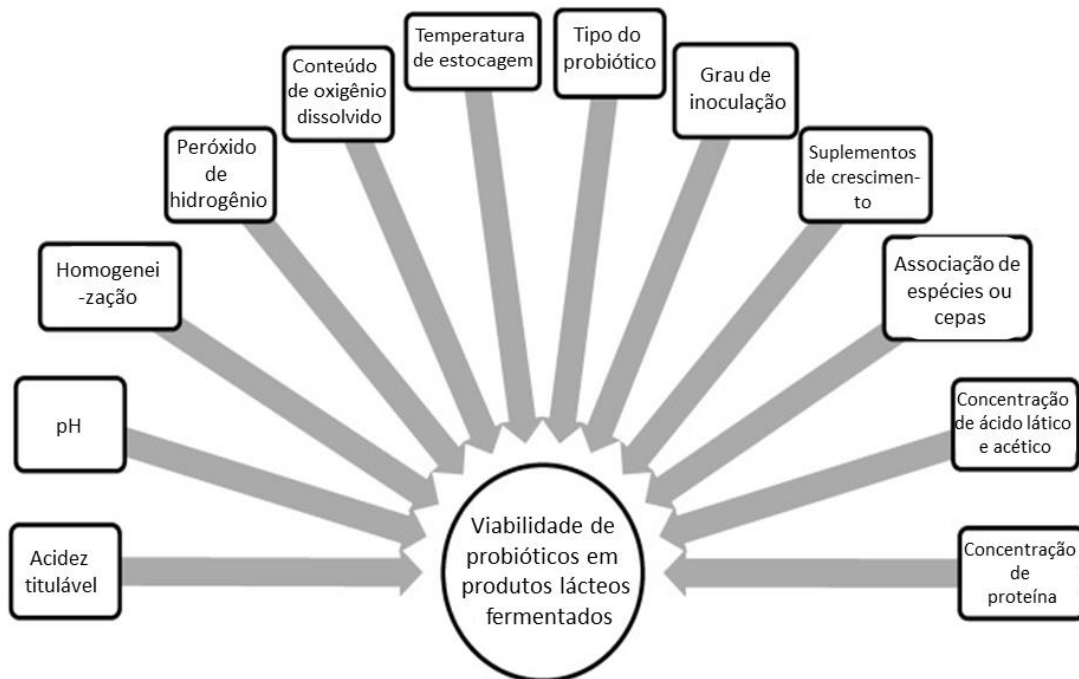
Os probióticos passam por situações de estresse desde as etapas industriais até seu uso pelo consumidor (TRIPATHI; GIRI, 2014). Ainda, podem enfrentar redução significativa durante a digestão em função do alimento em que é consumido junto ao probiótico. Um estudo de MATOUSKOVA *et al.*, 2021 empregando um modelo para digestão mostrou que o número de células viáveis que alcança o intestino pode sofrer reduções de 17,5 vezes devido à queda drástica do pH estomacal.

Além disso, a ingestão de sal durante o consumo do probiótico pode provocar estresse osmótico nas bactérias, afetando sua viabilidade também (MATOUSKOVA *et al.*, 2021). Com isso, é fundamental que o produto tenha alta contagem de células visto os obstáculos que esses

CAPÍTULO I

microrganismos passam no processamento, armazenamento e no trato gastrointestinal para que possam estabelecer suas funções benéficas ao hospedeiro, o que requer técnicas para aprimorar a sua viabilidade (FIG. 1.2).

FIGURA 1.2- Fatores que influenciam a viabilidade da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados



FONTE: MEYBODI, 2020., adaptada.

Diversos métodos estão sendo aplicados para aumentar a viabilidade de bactérias probióticas em alimentos durante o *shelf life*, como a microencapsulação e adição de prebióticos, que são as tecnologias mais comuns de serem estudados (MEYBODI *et al.*, 2020). Tecnologias emergentes também estão sendo aplicadas como estratégias para melhorar características físico-químicas, reológicas, sensoriais e também de otimizar a viabilidade probiótica como alta pressão, campo elétrico pulsado, uso da irradiação UV e o ultrassom de alta intensidade (BETORET *et al.*, 2017; EWE *et al.*, 2012; NAJIM; ARYANA, 2013).

1.3 Ultrassom de alta intensidade

O ultrassom (US) se trata de ondas sonoras acima de uma frequência de 20.000 Hz, que não são detectáveis pelo ouvido humano. O ultrassom de alta intensidade é caracterizado por frequências entre 20 e 500 kHz e intensidades maiores que 1 W.cm^{-2} . As ondas de ultrassom formadas por meio dos transdutores, que são equipamentos capazes de produzir o campo ultrassônico, converte a energia elétrica em mecânica na forma de vibrações ultrassônicas, que

CAPÍTULO I

são aplicadas ao produto alimentício diretamente usando o ultrassom de probe ou banho. (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al.*, 2019).

As ondas sonoras de US podem causar alterações físicas e químicas na estrutura dos alimentos, realizando a compressão das moléculas, com formação e colapso de microbolhas no meio líquido, promovendo as cavitações nessas estruturas. Dessa forma, a energia ultrassom pode exercer forças de cisalhamentos, rupturas, ou efeitos não destrutíveis, como a sonoporação (KÖRZENDÖRFER *et al.*, 2019).

A sonoporação se trata de formações de aberturas temporárias da membrana da célula por meio do surgimento de microbolhas, que possuem gás em seu interior, coberto por uma camada de lipídio, proteína ou polímero. Este núcleo cheio de gás é compressível e pode responder às ondas de pressão do ultrassom. Esse processo de crescimento e encolhimento alternados é denominado cavitação (LENTACKER; DE COCK; *et al.*, 2014).

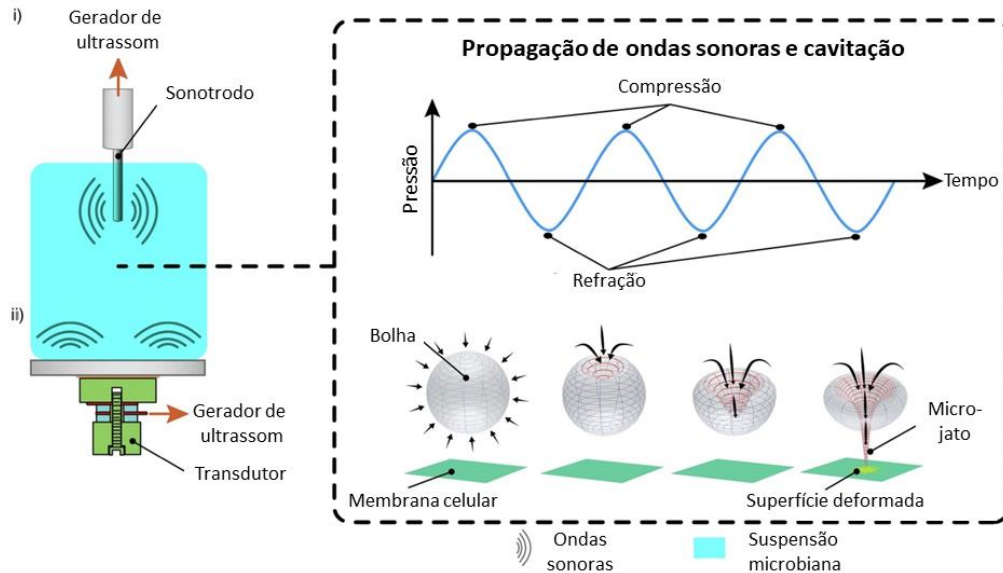
A formação de microbolhas provocada pela cavitação cria o *micro-streaming* ou os chamados jatos líquidos, que geram uma forte força de cisalhamento que rompe as estruturas das membranas celulares, causam perfurações na superfície da célula e resulta no aumento da permeabilidade de membrana (ABESINGHE *et al.*, 2019).

Logo, o efeito da sonoporação nas células dos micro-organismos pode melhorar a transferência de massa por meio da membrana celular, facilitar as reações enzimáticas com o aumento da taxa de transferência de massa dos reagentes para o sítio ativo, contribui para remoção de subprodutos de células metabolismo e, assim, melhorar o crescimento com a redução do tempo de fermentação (OJHA *et al.*, 2017a).

Pode-se considerar os efeitos positivos da utilização de ultrassom de alta intensidade sob a viabilidade de micro-organismos quando os parâmetros são ajustados para níveis subletais das células (HUANG *et al.*, 2017). Um dos principais parâmetros da HIUS é a densidade energética, que, em nível adequado, pode possibilitar a transferência de massa na membrana, sem causar o vazamento de todo conteúdo da célula (**FIG. 1.3**).

CAPÍTULO I

FIGURA 1.3 - Representação esquemática de uma formação de microjato através do colapso de bolhas de cavitação acústica. i) sistema baseado em sonda ultrassônica, ii) transdutor de banho ultrassônico



FONTE:PENG, Kaidi *et al*, 2020, **adaptada.**

A definição da densidade energética a ser utilizada no processo de sonicação é obtido combinando-se fatores como potência, tempo de aplicação, volume da amostra, frequência. Aumentando-se estes fatores, principalmente a potência, consegue-se atingir densidades energéticas mais altas como a 19 kHz e 300-600 J.mL⁻¹ podem promover a inativação de micro-organismos em leite cru (GUIMARÃES e SILVA *et al*, 2018).

O cálculo da densidade energética a ser utilizada no processo de sonicação, mostrado na Equação 1, é obtido multiplicando-se a potência pelo tempo de aplicação, dividindo-se pelo volume da amostra, normalmente expresso em J.mL⁻¹, sob determinada frequência.(GUIMARÃES e SILVA *et al*, 2018).

Equação 1:

$$DE \text{ (J/mL)} = \frac{\text{potência nominal (W)} \times \text{Tempo de Processo (s)}}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

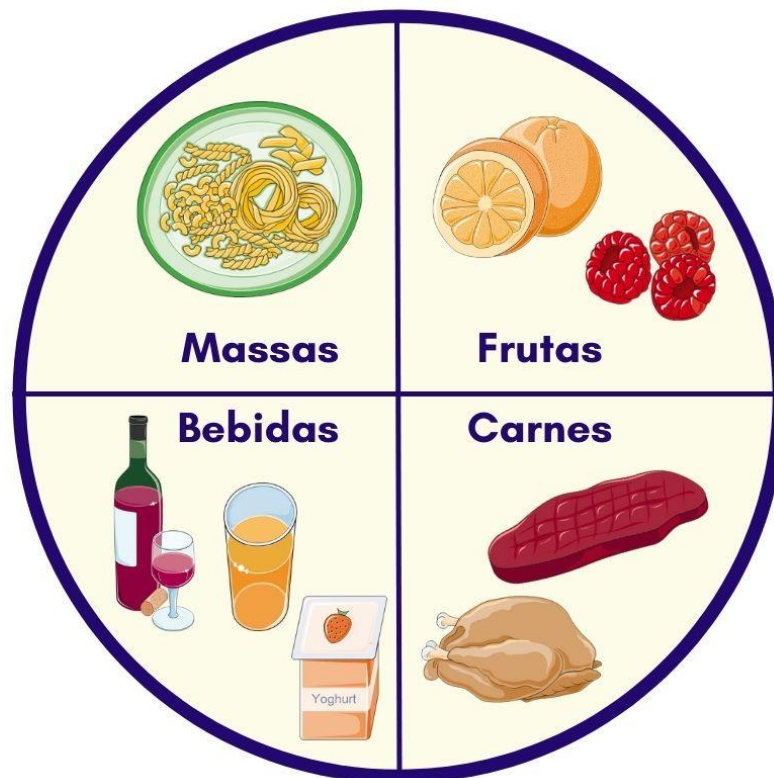
Por outro lado, uma baixa densidade energética pode não ser suficiente para causar sonoporação na membrana dos micro-organismos e ter os efeitos desejáveis de melhora da viabilidade celular, como observado no cultivo de micro-organismos probióticos em água destilada sob aplicação de US (RACIOPPO *et al.*, 2017).

CAPÍTULO I

1.3.1 Aplicação de HIUS em alimentos

A aplicação do ultrassom tem sido realizada em matrizes alimentares de diversificadas naturezas, em razão de diferentes propósitos (FIG. 1.4). DE ALMADA, 2017 desenvolveu um macarrão adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium animalis* inativados por diferentes processos, dentre eles o ultrassom. A inativação possibilitou a formação de paraprobióticos que foram adicionados em um macarrão com efeito funcional, uma vez que, quando consumido por camundongos, apresentou uma redução nos níveis de glicose e colesterol, quando comparado ao grupo controle.

FIGURA 1.4- Matrizes alimentares já submetidas ao tratamento de ultrassom



FONTE: Smart servier medical arts, adaptada.

O ultrassom também foi aplicado em frutas como mirtilo, nectarina, framboesa e melancia, bem como em outros vegetais, como alho, alcachofra de Jerusalém, alho-poró, cebolinha, alho de primavera e cebola branca. Em todos esses alimentos, o ultrassom possibilitou a extração de oligossacarídeos (OS), sendo que a concentração desses OS aumentou de 2 a 4 vezes em comparação com a extração convencional (JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015a).

CAPÍTULO I

(CAO *et al.*, 2021) aplicaram o ultrassom em carne de frango e constatou o aumento da porcentagem de água imobilizada na carne, devido à migração e à distribuição mais uniforme da água com o tratamento. Assim, um importante fator para a qualidade de produtos cárneos, a capacidade de retenção de água (CRA) foi melhorada com o uso de ultrassom. Similar efeito foi observado na carne de coelho, em que tempos de sonicação curtos atenuaram os efeitos do congelamento e resultaram em aumentos significativos no CRA, no final do armazenamento refrigerado (CARRILLO-LOPEZ *et al.*, 2021).

Há estudos que abordam a aplicação de ultrassom em bebidas como vinho, cervejas, xaropes e sucos. No caso do suco de cereja, um estudo específico evidenciou que tratamentos tradicionais, como pasteurização reduzia o teor de frutooligossacarídeos (FOS), enquanto o ultrassom possibilitou a inativação microbiana, mantendo a propriedade prebiótica do produto, além de melhorar a retenção de ácidos orgânicos e o teor de antocianinas (GOMES, WESLEY FARIA *et al.*, 2017).

Em produtos lácteos, a tecnologia de US se confirmou como um método muito plurivalente para o processamento desse tipo de matriz alimentar. Há relatos de sua aplicação na inativação microbiana, homogeneização, alteração na cristalização de lactose e água, bem como no aumento de compostos bioativos. Há também um efeito ainda em ampliação de conhecimentos do ultrassom, que é a modulação da atividade do probióticos (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al.*, 2019).

1.3.1.1 Possíveis alterações causadas pelo ultrassom em alimentos

O US pode ser usado para a filtração, a emulsificação, a desespumação, a degaseificação, o cozimento, a secagem, a extração de componentes bioativos de produtos da agroindústria, a inativação de micro-organismos e enzimas ou modulação de microbiota probiótica (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al.*, 2019). Dessa forma, pode-se categorizar os tipos de alterações causadas pelo ultrassom em microbianas, de perfil nutricional, reológicas e mecânicas.

Durante o funcionamento da tecnologia de US, ocorre o evento da cavitação em sistemas líquidos, o que gera ondas locais de altas temperaturas, alto cisalhamento, turbulência e ondas de pressão mecânica. Esses efeitos causam mudanças nas propriedades estruturais e físico-químicas dos alimentos, principalmente proteínas, como pode ser observado na **Tabela 1.3** (TONG *et al.*, 2022). Por essa razão, o processamento assistido por HIUS de 20 kHz de

CAPÍTULO I

diferentes potências pode melhorar, significativamente, a maciez da carne curada e iaque, devido aos efeitos da cavitação (BAO *et al.*, 2022).

TABELA 1.3- Alterações reológicas e mecânicas em alimentos submetidos ao tratamento de HIUS

Alteração	Efeito	Referência
	Melhoria na retenção de água em carne de frango	(CAO <i>et al.</i> , 2021)
	Alterações reológicas em géis de emulsão de proteínas do soro do leite	(CHENG <i>et al.</i> , 2019)
	Alterações reológicas em carne de iaque curada a seco	(BAO <i>et al.</i> , 2022)
Reológicas e Mecânicas		(CARRILLO-LOPEZ <i>et al.</i> , 2021)
	Melhoria na retenção de água em carne de coelho	(KÖRZENDÖRFE R <i>et al.</i> , 2019)
	Alterações reológicas em géis de leite fermentado enriquecidos com proteína para fabricação de iogurte grego	(KÖRZENDÖRFE R <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: dados da pesquisa.

CHENG *et al.*, 2019 relataram que o uso de US foi eficaz para melhorar as propriedades mecânicas do gel de emulsão de soro de leite. Isso ocorre devido à forte força de cisalhamento gerada pelo crescimento sequencial, associado à ruptura de bolhas de cavitação, o que leva à aceleração da nucleação espontânea da proteína monomérica e à fragmentação das fibrilas (TONG *et al.*, 2022).

KÖRZENDÖRFER *et al.*, 2019 também observaram que a aplicação de US durante a fermentação possibilitou o amolecimento do gel de conjunto, como consequente facilitação da agitação ao final do processo. Propriedades do iogurte grego como a aspereza visualmente percebida e a viscosidade aparente foram reduzidas.

Além de aprimorar as características reológicas e mecânicas de alimentos ricos em proteínas, o tratamento de US é reconhecido por sua capacidade de extrair compostos bioativos de alimentos, fato que pode promover alterações no perfil nutricional de alimentos (GUIMARÃES e SILVA *et al.*, 2019).

AADIL *et al.*, 2013 admitem melhorias no valor de turvação, teor de ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides e flavonóis em amostras de suco de toranja (**TAB. 1.4**). O aumento no teor desses compostos bioativos como o ácido ascórbico pode ser em detrimento do calor e

CAPÍTULO I

devido à presença de oxigênio serem fatores determinantes em sua degradação. Logo, o aumento desse antioxidante pode ser devido à remoção do oxigênio aprisionado às células com o evento da cavitação (AADIL *et al.*, 2013).

TABELA 1.4- Alterações no perfil nutricional em alimentos submetidas ao tratamento de HIUS

Alteração	Efeito	Referência
	Aproveitamento de prebióticos em bebida proteica de graviola.	(GUIMARÃES e SILVA <i>et al.</i> , 2019)
	Extração de OS em frutas (mirtilo, nectarina, framboesa e melancia) e vegetais (alho, alcachofra de Jerusalém, alho-poró, cebolinha, alho de primavera e cebola branca)	(JOVANOVIĆ-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUS EN, 2015b)
Perfil nutricional	Extração de compostos bioativos e mudanças físico-químicas em suco de toranja	(AADIL <i>et al.</i> , 2013)
	Mudanças na composição nutricional de leite cru e características de coagulação melhoradas	(MARCHESINI <i>et al.</i> , 2012)
	Extração de FOS em suco de cereja	(GOMES, WESLEY FARIA <i>et al.</i> , 2017)
	Aproveitamento de prebióticos em suco de morango	(CASSANI <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: dados da pesquisa.

Estudos evidenciam que as tecnologias térmicas não são viáveis para a produção de alimentos prebióticos como os FOS, pois eles são suscetíveis à degradação em altas temperaturas e também são altamente suscetíveis à hidrólise durante a pasteurização (GOMES, WESLEY FARIA *et al.*, 2017).

A fim de se avaliar a descontaminação com o uso de US em suco de laranja enriquecido com xilooligossacarídeos, SILVA, Eric Keven *et al.*, 2020 consideraram a tecnologia como uma técnica de promissora, devido à estabilidade química dos prebióticos a essa tecnologia emergente sob condições severas de processo. CASSANI *et al.*, 2017 analisaram o efeito de barreira da concentração de vanilina e do tempo de ultrassom na qualidade microbiológica e

CAPÍTULO I

sensorial do suco de morango após 14 dias de armazenamento a 5°C, que resultou em atributos microbianos e sensoriais aprimorados.

As alterações do perfil nutricional de alimentos com o uso de HIUS podem ser para além da preservação de prebióticos e do aumento do teor de compostos biotativos, como há mudanças no teor de certos nutrientes. Para efeito de ilustração, MARCHESINI *et al*, 2012 relataram o aumento de ácidos graxos livres em leite cru, possivelmente devido ao rompimento da membrana do glóbulo de gordura, propiciando a liberação de triacilgliceróis e outros lipídios, como colesterol e fosfolipídios, do núcleo dos glóbulos de gordura.

Em relação às alterações microbianas, a finalidade de inativação de enzimas e micro-organismos patogênicos e deteriorantes foi primariamente estudada como estratégia de se preservar os aspectos nutricionais e sensoriais dos alimentos (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al*, 2019).

Assim, o estudo do HIUS usando o tratamento de termossonicação de cerveja a 50 °C demonstra seu efeito na descontaminação, com a capacidade de se elevar os atributos sensoriais da cerveja (DENG *et al.*, 2018). O HIUS é uma tecnologia potencial e interessante para melhorar a sobrevivência e a funcionalidade das bactérias probióticas, devido à liberação de enzimas e hidrólise de carboidratos, à facilitação de troca de nutrientes, entre outros fatores que podem causar o aumento da atividade fermentativa e maior produção de metabólitos dos probióticos (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al*, 2019).

MUÑOZ *et al*, 2021 demonstraram que o HIUS pode ter um efeito reversível na vitalidade probiótica, com o prolongamento da fase LAG (de adaptação), seguido por uma recuperação do crescimento no vinho. NGUYEN *et al*, 2009 também constataram que o HIUS reduziu o tempo de fermentação necessário para atingir o pH 4,7 para amostras de leites fermentados com *B. infantis*, *B. breve* ATCC 15700 e BB-12.

A permeabilização de membrana, ocasionada pelo evento das cavitações que o HIUS promove, pode oportunizar a internalização de nutrientes e levar ao melhor desempenho no crescimento de lactobacilos, como *Lactobacillus acidophilus* BT 1088, *L. fermentum* BT 8219, *L. acidophilus* FTDC 8633, *L. gasseri* FTDC 8131, em extrato hidrossolúvel de soja suplementado com biotina (LIU, WEN SIN; YANG; FANG, 2018).

O HIUS também foi utilizado para intensificar o processo de secagem de cubos de maçã desidratados, adicionados de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 (TAB. 1.5). Os autores

CAPÍTULO I

RODRIGUES *et al.*, 2018 demonstraram que a aplicação do ultrassom aumentou a taxa de secagem em todos os casos, reduzindo, significativamente, o tempo de secagem, devido à cavitação. Ao final do processamento, o produto teve uma concentração de probióticos semelhante à concentração de micro-organismos nos produtos lácteos probióticos comerciais (RODRIGUES *et al.*, 2018).

TABELA 1.5- Alterações microbianas em alimentos submetidas ao tratamento de HIUS

Alteração	Efeito	Referência
	Alteração da atividade enzimática em extrato hidrossolúvel de soja	(LIU, WEN SIN; YANG; FANG, 2018)
	Melhoria na viabilidade probiótica em vinho	(MUÑOZ <i>et al.</i> , 2021)
	Melhoria na viabilidade probiótica em cubos de maçã desidratados	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2018)
	Melhoria na viabilidade probiótica em xarope de tâmara	(HASHEMI; ROOHI, 2019)
Microbiana	Melhoria na viabilidade probiótica em leite fermentado	(HASHEMI; ROOHI, 2019; NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009)
	Melhoria na viabilidade probiótica em extrato hidrossolúvel de soja suplementado com biotina	(EWE <i>et al.</i> , 2012)
	Viabilidade de paraprobióticos em macarrão	(DE ALMADA, 2017)
	Descontaminação em cerveja	(DENG <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: dados da pesquisa.

Além de aprimorar a viabilidade probiótica, o HIUS pode causar alterações nas enzimas microbianas, visto que o aumento da permeabilidade da membrana é possível provocar a liberação de enzimas intracelulares na rede de substratos da matriz alimentar, também pode reduzir a energia de ativação das enzimas, bem como aumentar a afinidade de enzimas para substratos (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al.*, 2019).

CAPÍTULO I

A melhora da atividade da β -galactosidase com US pode ser verificada em amostras de leite fermentado, em que o tratamento levou ao aumento das reações de transferência e hidrólise da lactose, fornecendo mais monossacarídeos, como galactose e glicose (NIAMAH, 2019). Desta forma, o tratamento HIUS também contribuiu para o aumento da atividade da β -glucosidase para $3,91 \text{ U.mL}^{-1}$, que foi 1,82 vezes maior do que sem tratamento de ultrassom, em uma bebida de soja fermentada com *L. acidophilus* BCRC 10695 (LIU, WEN SIN; YANG; FANG, 2018).

1.3.1.2 Parâmetros de ultrassom para modulação microbiana

Muitos são os efeitos positivos com a utilização de ultrassom de alta intensidade sob a viabilidade de micro-organismos, porém este efeito ainda requer mais clareza dos mecanismos que ocorrem nos tipos de produtos e nos parâmetros utilizados na sonicação, constituindo, portanto, em uma lacuna do conhecimento (HUANG *et al.*, 2017).

Estudos evidenciam que matrizes alimentares com uma maior diversidade de nutrientes, como o leite, possibilitam a aplicação de densidades energéticas consideradas mais altas, porque os micro-organismos possuem os constituintes da matriz (macromoléculas e até mesmo a viscosidade do produto) para protegê-los, atuando como uma barreira de proteção da cavitação acústica. (GUIMARÃES e BALTHAZAR *et al.*, 2019).

A morfologia da célula bacteriana também pode determinar quais parâmetros devem ser utilizados na aplicação de HIUS em um produto, devido ao fato de que as células maiores podem ser mais suscetíveis ao efeito da cavitação acústica, visto que possuem maiores superfícies de contato. Nesse sentido, o contrário também se aplica, quando células menores, como os cocos, podem ser mais resistentes do que bactérias em forma de bastonete (CHÁVEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

Em função disso, alguns fatores podem ser listados, no que tange ao impacto do efeito do tratamento de ultrassom de alta intensidade em diferentes produtos, como as propriedades físicas, biológicas ou morfológicas dos micro-organismos: cinética de cada célula, fase de crescimento, tamanho e espessura da cápsula, bem como os parâmetros de processo: potência, frequência, volume da amostra, tempo de sonicação, pressão, temperatura, volume do inóculo (ABESINGHE *et al.*, 2019) (TAB. 1.6).

TABELA 1.6- Parâmetros de ultrassom aplicados em diferentes matrizes alimentícias contendo micro-organismos

Matriz alimentícia	Micro-organismo	Parâmetro de ultrassom	Densidade energética	Referência
Xarope de tâmara	<i>Lactobacillus helveticus</i> (PTCC 1332)	Potência Nominal: 25 W; Tempo: 10, 20 e 30 min; Volume: 200 mL; sem controle de temperatura	75 – 225 J.mL ⁻¹ (Frequência: 30 kHz)	(HASHEMI <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (PTCC 1643)			
Soro de leite	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Potência Nominal: 84 - 102 W; Tempo: 75 e 150 s; Volume: 100 mL; Temperatura: 37°C	63 – 153 J.mL ⁻¹ (Frequência: 20 kHz)	(BARUKČIĆ <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>			
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (La-5)			
Leite de cabra fermentado	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (La-5) Cultura tradicional do iogurte	Potência Nominal: 201 W; Tempo: 3, 6 e 9 min; Volume: 150 mL; Temperatura: 8 °C	241 – 723,6 J.mL ⁻¹ (Frequência: 20 kHz)	(DELGADO <i>et al.</i> , 2020)
Solução de peptona em diferentes concentrações (2, 6 e 10 g/L)	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> (ATCC 39392)	Potência Nominal: 40, 80 e 120 W; Tempo: 15, 30 e 45 s; Volume: 50 mL; Temperatura: <10 °C	12 – 108 J.mL ⁻¹ (Frequência: 24 kHz)	(DAHROUD <i>et al.</i> , 2016)
Leite desnatado fermentado	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Potência: 100 W/L; Tempo: 0,5, 1, 2, 3 e 4 h; Temperatura: 37°C	180 – 1440 J.mL ⁻¹ (Frequência: 28 kHz)	(HUANG <i>et al.</i> , 2019)
Leite fermentado	<i>Bifidobacterium breve</i> (ATCC 15700)	Potência: 30 W; Tempo: 7, 15 e 30 min; Volume: 100 mL; Temperatura: <10 °C	126 – 540 J.mL ⁻¹ (Frequência: 20 kHz)	(NGUYEN; LEE; ZHOU, 2012)
	<i>Bifidobacterium infantis</i>			
	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> (BB-12)			
	<i>Bifidobacterium longum</i> (BB-46)			
Leite fermentado	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	Potência Nominal: 34,8 W; Tempo: 0,5, 10, 15 e 20 mi; Volume: 100 mL; sem controle de temperatura	10,44 – 417,6 J.mL ⁻¹ (Frequência: 40 kHz)	(NIAMAH, 2019)
	<i>Lactobacillus casei</i> (LC)			
	<i>Lactobacillus reuteri</i> (LR-MM53)			
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (Bb-12)			
	<i>Bifidobacterium longum</i> (BB-536)			

Fonte: dados de pesquisa.

HASHEMI *et al.*, 2018 avaliaram o crescimento celular, o consumo de substratos e a formação de produtos durante a fermentação do xarope de tâmara. Constataram que os *Lactobacillus helveticus* PTCC 1332 e *L. acidophilus* PTCC 1643 tiveram o crescimento

CAPÍTULO I

estimulado, aumentaram o consumo de açúcar e a produção de ácido láctico com os parâmetros de DE em 10 e 20 minutos de 75 e 150 J.mL⁻¹, enquanto o tratamento mais prolongado, de 30 minutos com DE de 225 J.mL⁻¹ afetou, negativamente, o crescimento celular.

BARUKČIĆ *et al*, 2015 avaliaram a ativação ultrassônica das culturas lácteas selecionadas (*L. acidophilus* La-5, cultura do iogurte YC-380) na fermentação de soro de leite, utilizando DE de 126 J/mL que resultou em 0,5 h de fermentação em menos tempo com monocultura La-5 em comparação com a amostra controle.

Por outro lado, DELGADO *et al*, 2020 utilizaram densidades energéticas entre 241 e 723,6 J.mL⁻¹ no leite de cabra fermentado. O tratamento com DE de 482,4 J.mL⁻¹, ocasionou o aumento da viscosidade, que é interessante para o leite de cabra, que é muito pouco viscoso. Porém a aplicação direta de todos os tratamentos HIUS reduziu a viabilidade das bactérias probióticas, baseando-se nos resultados obtidos na fermentação do soro de leite dos autores (BARUKČIĆ *et al.*, 2015) anteriormente mencionados. Talvez uma densidade energética menor do que as utilizadas no leite de cabra fermentado seria mais apropriada para modular, positivamente, a microbiota probiótica de *L. acidophilus* La-5, o que deve ser bem ajustado porque são matrizes alimentícias distintas.

Um estudo aplicou o ultrassom em solução de peptona em diferentes concentrações (2, 6 e 10 g.L⁻¹) contendo *Lactobacillus casei* e obteve melhora na atividade metabólica com uma DE de 36 J.mL⁻¹, uma densidade energética baixa comparada às já relatadas anteriormente em outras cepas de *Lactobacillus*. Trata-se de uma matriz pouco complexa em contraste com a matriz alimentar como o leite (DAHROUD *et al.*, 2016).

Essa observação pode ser ilustrada com os resultados de HUANG *et al*, 2019, que observaram o aumento das atividades enzimáticas extracelulares das proteases ácidas, neutras e alcalinas no leite desnatado fermentado com *Lactobacillus paracasei* usando o parâmetro de ultrassom de DE ótima a 180 J/mL⁻¹.

NGUYEN *et al*, 2012 demonstram que o de HIUS com DE entre 126 e 540 J.mL⁻¹ pode acelerar a hidrólise da lactose e a transgalactosilação de bifidobactérias no leite, abrindo uma possibilidade para equilibrar a relação entre o acetato e o lactato e entre o total de acetato e propionato a lactato em leite fermentado filtrado por BB-12 e BB-46, respectivamente.

O autor NIAMAH, 2019 encontrou resultados que demonstram que o HIUS, com DE de 208,8 J.mL⁻¹, teve os melhores resultados, aumentando o número de células viáveis em 5%

CAPÍTULO I

de *Bifidobacterium longum* (BB-46), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus casei* (LC), *Lactobacillus reuteri* (LR-MM53), *Bifidobacterium bifidum* (Bb-12), *Bifidobacterium longum* (BB-536) e a atividade da enzima β -galactosidase das formulações de leite fermentado.

Portanto, entende-se que os vários resultados já relatados sobre a aplicação de ultrassom de alta intensidade em alimentos, em especial para a modulação microbiana, ainda requerem uma maior compreensão acerca do emprego de HIUS.

CAPÍTULO I

REFERÊNCIAS

- AADIL, Rana Muhammad *et al.* Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3201–3206, 1 dez. 2013.
- ABESINGHE, A. M.N.L. *et al.* Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 90, p. 1–14, 1 mar. 2019.
- AĞAGÜNDÜZ, Duygu *et al.* Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. **Food Bioscience**, v. 47, 1 jun. 2022.
- ANJUM, Nazia *et al.* *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 9, p. 1241–1251, 2014.
- BAGCHI, T. Traditional food & modern lifestyle: Impact of probiotics. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 140, n. 3, p. 333, 1 set. 2014.
- BAO, Gaoliang *et al.* Effects of ultrasound pretreatment on the quality, nutrients and volatile compounds of dry-cured yak meat. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 82, p. 105864, 1 jan. 2022.
- BARUKČIĆ, Irena *et al.* Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 94–101, 1 fev. 2015.
- BERNUCCI, Beatriz S.P. *et al.* Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **LWT**, v. 80, p. 341–347, 1 jul. 2017.
- BETORET, E. *et al.* Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 418–422, 1 nov. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Aprova Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 24 de outubro de 2007, Seção 1, p. 5.
- BRASIL, Ministério da Saúde, 2019. Guia N° 21. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 de julho de 2018, Seção 1, p. 3.
- CANNARELLA, Ligia Aparecida Trintin *et al.* Mixture of probiotics reduces inflammatory biomarkers and improves the oxidative/nitrosative profile in people with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, v. 89, p. 111282, 1 set. 2021.

CAPÍTULO I

CAO, Changwei *et al.* Effect of ultrasound-assisted enzyme treatment on the quality of chicken breast meat. **Food and Bioproducts Processing**, v. 125, p. 193–203, 1 jan. 2021.

CARRILLO-LOPEZ, Luis M. *et al.* Post-mortem ultrasound and freezing of rabbit meat: Effects on the physicochemical quality and weight loss. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, p. 105766, 1 nov. 2021.

CASSANI, L. *et al.* Optimization of inulin: Oligofructose proportion and non-thermal processing to enhance microbiological and sensory properties of fiber-enriched strawberry juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 446–455, 2017.

CASTRO, Vanessa Moraes Ramalho *et al.* Role of milk and honey in the tolerance of *Lactobacilli* to oxidative stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 883, 1 jun. 2021.

CHÁVEZ-MARTÍNEZ, América *et al.* Low and High-Intensity Ultrasound in Dairy Products: Applications and Effects on Physicochemical and Microbiological Quality. **Foods**, vol. 9, Page 1688, v. 9, n. 11, p. 1688, 18 nov. 2020.

CHENG, Yu *et al.* Effect of ultrasound pretreatment with mono-frequency and simultaneous dual frequency on the mechanical properties and microstructure of whey protein emulsion gels. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 434–442, 1 abr. 2019.

CRUZ, Adriano G. *et al.* Sensory analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 358–373, 2010.

DAHROUD, Behnaz Dahri *et al.* Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 462–467, 1 maio 2016.

DE ALMADA, Caroline N. **Paraprobióticos: impacto de métodos de inativação sobre a eficácia, estabilidade em alimento e efeitos benéficos à saúde**, 78 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2017.

DE ALMADA, Caroline N. *et al.* Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 58, p. 96–114, 2016.

DE OLIVEIRA, Patrícia Martins *et al.* Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic *Lactobacilli*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 98, 1 jan. 2021.

DELGADO, Karina *et al.* Different ultrasound exposure times influence the physicochemical and microbial quality properties in probiotic goat milk yogurt. **Molecules**, v. 25, n. 20, 1 out. 2020.

CAPÍTULO I

DENG, Yang *et al.* Influence of ultrasound assisted thermal processing on the physicochemical and sensorial properties of beer. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, p. 166–173, 1 jan. 2018.

DIOSO, Clarizza May *et al.* Do your kids get what you paid for? evaluation of commercially available probiotic products intended for children in the republic of the Philippines and the Republic of Korea. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1229, 1 set. 2020.

EWE, Joo Ann *et al.* Enhanced growth of *Lactobacilli* and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 1, p. 160–173, 1 jan. 2012.

FAO releases 2020 dairy report - **Dairy Industries International**.

GARCÍA-BURGOS, María *et al.* New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104059, 1 set. 2020.

GOMES, C. Aline; HOFFMANN, Christian; MOTA, João Felipe. Gut microbiota is associated with adiposity markers and probiotics may impact specific genera. **European journal of nutrition**, v. 59, n. 4, p. 1751–1762, 1 jun. 2020.

GOMES, Wesley Faria *et al.* Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. **Food Chemistry**, v. 218, p. 261–268, 2017.

GU, Yuxiang *et al.* Evaluation of FAAs and FFAs in yogurts fermented with different starter cultures during storage. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103666, 2020.

GUIMARÃES, Jonas T.; SILVA, Eric Keven; *et al.* Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 55, p. 157–164, 1 jul. 2019.

GUIMARÃES, Jonas T.; BALTHAZAR, Celso F.; *et al.* High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 57, n. March, p. 12–21, 2019.

GUIMARÃES, Jonas T.; SILVA, Eric Keven; *et al.* Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 44, p. 251–260, 1 jun. 2018.

HADIDI, Milad *et al.* Alginate/Fish Gelatin-Encapsulated *Lactobacillus acidophilus*: A Study on Viability and Technological Quality of Bread during Baking and Storage. **Foods**, v. 10, n. 9, 1 set. 2021.

HAJIFARAJI, Majid *et al.* Effect of probiotic supplements in women with gestational diabetes *mellitus* on inflammation and oxidative stress biomarkers: a randomized clinical trial. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 27, n. 3, p. 581–591, 1 mai. 2018.

HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher *et al.* Effect of ultrasound on lactic acid production by *Lactobacillus* strains in date (*Phoenix dactylifera* var. *Kabkab*) syrup. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2635–2644, 1 mar. 2018.

CAPÍTULO I

- HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher; ROOHI, Reza. Kinetic models for production of propionic acid by *Propionibacter freudenreichii* subsp. *shermanii* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in date syrup during sonication treatments. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 613–619, 1 jan. 2019.
- HUANG, Guoping *et al.* Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 144–149, 1 jul. 2017.
- HUANG, Guoping *et al.* Stimulation of low intensity ultrasound on fermentation of skim milk medium for yield of yoghurt peptides by *Lactobacillus paracasei*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, p. 315–324, 1 mar. 2019.
- IM, A. Rang *et al.* Skin Moisturizing and Antiphotodamage Effects of Tyndallized *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 10, p. 1016–1023, 16 out. 2018.
- JOVANOVIĆ-MALINOVSKA, Ruzica; KUZMANOVA, Slobodanka; WINKELHAUSEN, Eleonora. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 446–453, 2015.
- KANG, Mi-Sun *et al.* Comparison of Temperature and Additives Affecting the Stability of the Probiotic *Weissella cibaria*. **Chonnam Medical Journal**, v. 48, n. 3, p. 159, 2012.
- KANURIĆ, Katarina Gojko *et al.* Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 4, p. 1229–1234, 1 out. 2018.
- KONSTANTINOV, Sergey R.; KUIPERS, Ernst J.; PEPPELENBOSCH, Maikel P. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 12, p. 741–745, 2013.
- KÖRZENDÖRFER, Adrian *et al.* Power ultrasound as a tool to improve the processability of protein-enriched fermented milk gels for Greek yogurt manufacture. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, p. 7826–7837, 2019.
- KWOFIE, Mabel Kyei *et al.* Probiotics Potential of Yeast and Lactic Acid Bacteria Fermented Foods and the Impact of Processing: A Review of Indigenous and Continental Food Products. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 492–507, 10 set. 2020.
- LANG, Fengxuan *et al.* Evaluation of probiotic yoghurt by the mixed culture with *Lactobacillus plantarum* A3. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 2, p. 323–331, 1 mar. 2022.
- LASTA, Everton Luiz *et al.* Encapsulation and dispersion of *Lactobacillus acidophilus* in a chocolate coating as a strategy for maintaining cell viability in cereal bars. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 15 out. 2021.
- LENTACKER, I.; DE COCK, I.; *et al.* Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 72, p. 49–64, 15 jun. 2014.

CAPÍTULO I

LI, Hongbo *et al.* Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. **LWT**, v. 122, p. 109033, 1 mar. 2020.

LI, Sing Chung *et al.* *Lactobacillus acidophilus*-Fermented Germinated Brown Rice Suppresses Preneoplastic Lesions of the Colon in Rats. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2718 1 nov. 2019.

LIM, Hye Yeon *et al.* Antiwrinkle and Antimelanogenesis Effects of Tyndallized *Lactobacillus acidophilus* KCCM12625P. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, p. 1620, 27 fev. 2020.

LIU, Wen Sin; YANG, Chun Yao; FANG, Tony J. Strategic ultrasound-induced stress response of lactic acid bacteria on enhancement of β -glucosidase activity for bioconversion of isoflavones in soymilk. **Journal of Microbiological Methods**, v. 148, p. 145–150, mar. 2018.

LIU, Zhenbin; BHANDARI, Bhesh; ZHANG, Min. Incorporation of probiotics (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) into 3D printed mashed potatoes: Effects of variables on the viability. **Food Research International**, v. 128, p. 108795, 2020.

LUZ, Carlos *et al.* Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. **Journal of Functional Foods**, v. 84, p. 104, 1 set. 2021.

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. 25, 1 mai. 2014.

MARCHESINI, Giorgio *et al.* Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 391, 2012.

MARQUES, Thaiane *et al.* Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation associated with enzymatic crosslinking under application in different fruit juices. **Food Research International**, v. 141, p. 110, 1 mar. 2021.

MATOUSKOVA, Petra *et al.* Stress effect of food matrices on viability of probiotic cells during model digestion. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 1 ago. 2021.

MEYBODI, Neda Mollakhalili *et al.* Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104793, 1 out. 2020.

MITUNIEWICZ-MAŁEK, A. *et al.* Short communication: Effect of the addition of *Bifidobacterium* monocultures on the physical, chemical, and sensory characteristics of fermented goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 6, 2017.

MUÑOZ, Raquel *et al.* Effects of ultrasound treatments on wine microorganisms. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, p. 10, 1 nov. 2021.

NAJIM, N.; ARYANA, Kayanush J. A mild pulsed electric field condition that improves acid tolerance, growth, and protease activity of *Lactobacillus acidophilus* LA-K and *Lactobacillus*

CAPÍTULO I

delbrueckii subspecies *bulgaricus* LB-12. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3, 1 jun. 2013.

NG, Elizabeth W.; YEUNG, Marie; TONG, Phillip S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 5, 31 jan. 2011.

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of *Bifidobacteria* in milk fermentation. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 866–874, 15 fev. 2012.

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Stimulating fermentative activities of *Bifidobacteria* in milk by highintensity ultrasound. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 6, 1 jun. 2009.

NIAMAH, Alaa Kareem. Ultrasound treatment (low frequency) effects on probiotic bacteria growth in fermented milk. **Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2019.

NIAMSIRI, N; BATT, C A. Dairy Products. **Encyclopedia of Microbiology**, v. 9. 3e. ed., p. 34–44, 2009.

NIELSEN, Søren D. *et al.* Chemically acidified, live and heat-inactivated fermented dairy yoghurt show distinct bioactive peptides, free amino acids and small compounds profiles. **Food Chemistry**, v. 376, p. 2, 15 mai. 2022.

OJHA, K. Shikha *et al.* Ultrasound technology for food fermentation applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 414, 2017.

OLIVEIRA, Denize *et al.* Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 234–241, 2017.

OLIVEIRA, Ricardo P.S. *et al.* Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 467–472, 15 jan. 2009.

PARVANEH, Jafarei; MARYAM, Tajabadi Ebrahimi. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 24, p. 4033-4042, 2011.

PENG, Jiangying *et al.* Untargeted metabolic footprinting reveals key differences between fermented brown milk and fermented milk metabolomes. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, p. 2771–2790, 1 abr. 2022.

PENG, Kaidi *et al.* Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 137, p. 109544, jul 2020.

PÉREZ-ALVA, A. *et al.* Fermentation of algae to enhance their bioactive activity: A review. **Algal Research**, v. 64, p. 10, 1 mai. 2022.

CAPÍTULO I

PERINI, Fabiana Oliveira. **Avaliação da multiplicação de *Bacillus thuringiensis* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva**. 2014. 23 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PIMENTEL, Tatiana Colombo *et al.* Probiotic non-dairy frozen dessert: Technological and sensory aspects and industrial challenges. **Trends in Food Science and Technology**, v. 107, p. 381–388, 1 jan. 2021.

PIMENTEL, Tatiana Colombo *et al.* Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 1 set. 2015.

POTOROKO, I. *et al.* Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 463–472, 1 nov. 2018.

QUALFOOD, 23 nov. 2021. **Produção de leite aumentou em 2020 na Europa**. Disponível em: <<https://www.qualfood.com/noticias/item/2762-producao-de-leite-aumentou-em-2020-na-europa>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

RACIOPPO, Angela *et al.* International Journal of Food Microbiology Ultrasound attenuation of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*: Effect on some technological and probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 243, p. 78–83, 2017.

RADDATZ, Greice Carine. **Estudo da adição de diferentes prebióticos em micropartículas simbióticas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtidas por gelificação iônica interna**. 23 fev, 2018. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

RECCHIA, G. Bruna Rafaela. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada a base de soro lácteo ácido: caracterização físico-química e reológica**. 7 nov, 2014. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RIBEIRO, Maria Cecília E. *et al.* Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424–431, 1 dez. 2014.

RODRIGUES, Sueli *et al.* Development of dried probiotic apple cubes incorporated with *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Journal of Functional Foods**, v. 41, p. 48–54, 1 fev. 2018.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 3, p. 241–264, 1994.

SAKANDAR, Hafiz Arbab; ZHANG, Heping. Trends in Probiotic(s)-Fermented milks and their in vivo functionality: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 55–65, 1 abr. 2021.

CAPÍTULO I

SERGEEV, Igor N. *et al.* Effects of Synbiotic Supplement on Human Gut Microbiota, Body Composition and Weight Loss in Obesity. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2020.

SFAKIANAKIS, P.; TOPAKAS, E.; TZIA, C. Comparative Study on High-Intensity Ultrasound and Pressure Milk Homogenization: Effect on the Kinetics of Yogurt Fermentation Process. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 3, p. 548–557, 1 mar. 2015.

SILVA, Eric Keven *et al.* Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 63, p. 104942, dez. 2020.

SILVA, Jaqueline Ferreira. **Caracterização microbiológica e pós-acidificação de leites fermentados comercializados em Barra do Garças-MT**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Instituto de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal de Mato Grosso, campus Universitário Do Araguaia, Barra do Garças – MT, 2019.

SONG, Xinling; FU, Haiyan; CHEN, Wei. Effects of *Flammulina velutipes* polysaccharides on quality improvement of fermented milk and antihyperlipidemic on streptozotocin-induced mice. **Journal of Functional Foods**, v. 87, p. 10, 1 dez. 2021.

STECCA, Isadora *et al.* Análise das principais tendências no mercado brasileiro de iogurtes analysis of the main trends in the brazilian yogurt market. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 2, p. 523-534, dez. 2020.

SUN, Yaru *et al.* Mesopic fermentation contributes more to the formation of important flavor compounds and increased growth of *Lactobacillus casei* Zhang than does high temperature during milk fermentation and storage. **Journal of dairy science**, v. 105, n. 6, p. 4857–4867, 1 jun. 2022.

TERPOU, Antonia *et al.* Enhanced probiotic viability and aromatic profile of yogurts produced using wheat bran (*Triticum aestivum*) as cell immobilization carrier. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 1–10, 1 abr. 2017.

TONG, Xiaohong *et al.* Changes in structure, rheological property and antioxidant activity of soy protein isolate fibrils by ultrasound pretreatment and EGCG. **Food Hydrocolloids**, v. 122, p. 107084, 1 jan. 2022.

TONUCCI, B. Livia *et al.* Clinical application of probiotics in type 2 diabetes *mellitus*: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 85–92, 1 fev. 2017.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn *et al.* Drinking fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* 431 (IMULUS™) improves immune response against H₁N₁ and cross-reactive H₃N₂ viruses after influenza vaccination: A pilot randomized triple-blinded placebo controlled trial. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 1–10, 1 jun. 2017.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 1 jul. 2014.

CAPÍTULO I

TSILIKA, Maria *et al.* A four-probiotic preparation for ventilator-associated pneumonia in multi-trauma patients: results of a randomized clinical trial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, p. 106471, 1 jan. 2022.

TSILINGIRI, K.; RESCIGNO, M. Postbiotics: What else? **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 1, p. 101–107, 2013.

USMANI, Zeba *et al.* Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 346, p. 6, 1 fev. 2022.

VIEIRA, C. Michele. **Produção de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionada de polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) utilizando cultura láctea tradicional do iogurte e linhagem probiótica**. 30 nov., 2017. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2017.

WANG, Cuina *et al.* Effects of polymerized whey protein on survivability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during freeze-drying. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 8, p. 2708, 2019.

ZHANG, S. S. *et al.* Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 with yogurt starter cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3045–3054, 2020.

ZHENG, Jinshui *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 15 abr. 2020.

ZHONG, Z. *et al.* Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7832–7841, 1 out. 2016.

2 CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE NAS CARACTERÍSTICAS MICROBIANAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE LEITES FERMENTADOS

RESUMO

O lento metabolismo de bactérias no processo fermentativo pode comprometer a viabilidade microbiana, assim, o uso de Ultrassom de Alta Intensidade (HIUS) representa uma possibilidade tecnológica para otimizar a atividade metabólica destes microrganismos em processos fermentativos. As ondas sonoras de HIUS podem causar alterações na membrana celular com o efeito da sonoporação, com conseqüente melhora na transferência de massa, facilitação das reações enzimáticas e remoção de subprodutos do metabolismo celular. Para se ter este efeito é preciso se compreender os fatores que podem impactar na proporção tratamento HIUS em diferentes produtos, como as propriedades físicas, biológicas ou morfológicas de cada micro-organismo, bem como os parâmetros de processo e tipo de matriz alimentar. Por isso, este estudo buscou avaliar o efeito do HIUS no tempo de fermentação e na viabilidade microbiana dos seguintes leites fermentados: iogurte (só com a cultura protossimbiótica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), um leite fermentado contendo somente *Lactobacillus acidophilus* La 5, e um terceiro produto em co-cultura do iogurte mais *Lactobacillus acidophilus* La 5. Três diferentes densidades energéticas foram utilizadas para sonicar cada produto no banho 0,08, 0,26 e 0,65 J.mL⁻¹ no banho e outras três DE de 1600, 640 e 200 J.mL⁻¹ na sonda, em ambos equipamentos com as amostras submersas em um banho de temperatura de 10 e 25°C. Quando comparado ao tratamento sem ultrassom o iogurte teve seu tempo de fermentação reduzido em 31,87 minutos com a densidade energética de 640 J.mL⁻¹ e um conteúdo superior de bactérias ácido lácticas totais, no valor de log igual a 8,29 UFC.mL⁻¹, sendo que que o conteúdo sem ultrassom foi de 7,73. O leite fermentado contendo só *Lactobacillus acidophilus* La 5 teve seu tempo final de fermentação reduzido em 16,33 minutos usando-se a densidade energética de 200 J.mL⁻¹ e um teor de *Lactobacillus a. La 5* de log igual a 8,56 UFC.mL⁻¹, quando o produto sem ultrassom apresentou log de 7,80 UFC.mL⁻¹. O leite fermentado contendo a cultura do iogurte e a cultura probiótica teve seu tempo de fermentação final aumentado nas amostras tratadas com o ultrassom, estudos apontam que o ultrassom em níveis subletais promove a inativação de algumas células, e é necessário um tempo de fermentação inicial específico para que as células remanescentes compensem a redução inicial no tempo de fermentação, o que pode explicar, que neste caso o ultrassom não contribuiu para otimização do processo fermentativo. Portanto, se torna mais interessante aplicar o ultrassom separadamente nos leites fermentados só com culturas tradicionais do iogurte ou só com *Lactobacillus acidophilus* La 5. Os parâmetros físico-químicos e a viabilidade microbiana não sofreram influência após o tempo de estocagem dos

CAPÍTULO II

três leites fermentados em todos tratamentos, no caso dos tratamentos em banho ultrassônicos o HIUS não apresentou influência também no tempo de fermentação. Bem como as temperaturas de aplicação de HIUS não apresentaram diferença entre si, portanto, a temperatura de 25°C seria a mais indicada para o tratamento com DE de 640 J.mL⁻¹ no LF só com a cultura tradicional do iogurte e com DE de 200 J.mL⁻¹ no LF com a cultura tradicional do iogurte e a cultura probiótica.

Palavras-chave: Densidade energética, sonda, banho ultrassônico, tempo de fermentação.

ABSTRACT

The slow metabolism in the fermentation process may have a microbial fermentation process, as well as the technology, the use of high metabolic intensity ultrasound (HIUS) represents a possibility to optimize the activity of microorganisms in fermentation processes. Sound waves from HIUS can cause changes in the cell membrane with the effect of sonoporation, with improvement in mass transfer, facilitation of enzymatic reactions and cellular removal of metabolism by-products. To have this effect, it is necessary to understand the factors that can impact the proportion of HIUS treatment in different products, such as the physical, biological or morphological properties of each microorganism, as well as the process parameters and type of food matrix. Therefore, this study sought to evaluate the effect of HIUS on fermentation time and microbial viability of the following fermented milks: yogurt (only with the protosymbiotic culture of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*), a fermented milk containing only *Lactobacillus acidophilus* La 5, and a third product in co-culture of yogurt plus *Lactobacillus acidophilus* La 5. Three different energy densities were used to sonicate each product in the bath 0,08, 0,26 and 0,65 J.mL⁻¹ in the bath and another three DE of 1600, 640 and 200 J.mL⁻¹ in the probe, in both equipment with the samples submerged in a temperature bath of 10 and 25°C. When compared to the treatment without ultrasound, yogurt had its fermentation time reduced by 31,87 minutes with an energy density of 640 J.mL⁻¹ and a higher content of total lactic acid bacteria, in the log value equal to 8,29 CFU.mL⁻¹, and the content without ultrasound was 7,73. The fermented milk containing only *Lactobacillus acidophilus* La 5 had its final fermentation time reduced by 16,33 minutes using an energy density of 200 J.mL⁻¹ and a *Lactobacillus A. La 5* content of log equal to 8,56 CFU.mL⁻¹, when the product without ultrasound showed a log of ,80 CFU.mL⁻¹. The fermented milk containing the yogurt culture and the probiotic culture had its final fermentation time increased in the samples treated with ultrasound, studies indicate that ultrasound at sublethal levels promotes the inactivation of some cells, and a specific initial fermentation time is required. for the remaining cells to compensate for the initial reduction in fermentation time, which may explain that in this case the ultrasound did not contribute to the optimization of the fermentation process. Therefore, it becomes more interesting to apply the ultrasound separately to milks fermented only with traditional yogurt cultures or only with *Lactobacillus acidophilus* La 5. The physicochemical parameters and microbial viability were not influenced after the storage time of the three fermented milks in all treatments, in the case of the ultrasonic bath

CAPÍTULO II

treatments the HIUS also did not influence the fermentation time. As well as the temperatures of application of HIUS showed no difference between them, therefore, the temperature of 25°C would be the most indicated for the treatment with DE of 640 J.mL⁻¹ in the LF only with the traditional culture of yogurt and with DE of 200 J.mL⁻¹ in the LF with the traditional yogurt culture and the probiotic culture.

Keywords: Energy density, probe, ultrasonic bath, fermentation time.

CAPÍTULO II

2.1 INTRODUÇÃO

O iogurte é o produto lácteo fermentado mais popular e difundido em todo o mundo, trata-se do resultado da transformação do leite através do consumo da lactose por bactérias viáveis. O produto final apresenta um menor teor de lactose, comparado ao leite, sobretudo, as lactases ainda podem digerir a lactose no intestino delgado, o que explica o fato da lactose do iogurte ser melhor digerida do que a lactose do leite (SOUZA OLEGARIO *et al.*, 2022).

Este tipo de leite fermentado é considerado como uma fonte de proteína de alto potencial biológico, de energia, gordura, vitaminas, também possui propriedades organolépticas e nutricionais apreciada pelos consumidores (MADA *et al.*, 2022). Além disso, em categoria de lanches, os iogurtes são melhores fontes de nutrientes, contrapondo sorvetes, tortas, bolos e refrigerantes (HESS; RAO; SLAVIN, 2017)

As características dos iogurtes podem se diferir pelos tipos de culturas iniciadoras adicionados, mas, a legislação brasileira estabelece que para receber tal denominação, este leite fermentado deve ter a presença dos cultivos protossimbióticos *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Essas culturas lácteas cumprem a simbiose durante o processo fermentativo, em que cada linhagem libera metabólitos que estimulam o crescimento concomitante de ambas e confere sabor, aroma e textura característicos do iogurte (BARTH, 2014).

Além das propriedades nutritivas intrínsecas do iogurte tradicional, ele também pode servir como excelente carreador para a formulação de alimentos funcionais (ANTONOPOULOU *et al.*, 2022). Dentre os alimentos funcionais, têm-se a categoria dos probióticos, muitas vezes carregada em leites fermentados, veículos mais populares para sua incorporação em alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2014).

O efeito benéfico à saúde do consumidor atribuído aos probióticos requer a viabilidade do micro-organismo após as etapas do processo de fabricação, a sua estocagem e também a sua passagem pelo trato gastrointestinal, que perpassa pelo ambiente gástrico, pelas enzimas hidrolíticas e sais biliares (DEL PIANO *et al.*, 2006; HELLER, 2001; LIU, ZIYU *et al.*, 2007). Os ácidos e sais biliares se tornam um fator condicionante para o uso de algumas cepas com alegação probiótica, a exemplo da espécie *Lactobacillus acidophilus* (CHOU e WEIMER, 1999; HANSEN *et al.*, 2002; MOHAMMADI *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2014).

CAPÍTULO II

Cepas desta espécie, como o *L. acidophilus* LA-5 apresenta diferentes mecanismos para cumprir benefícios à saúde do consumidor, como combate à pneumonia, o aumento do controle glicêmico em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, o combate a inflamação em mulheres com diabetes mellitus gestacional (HAJIFARAJI *et al.*, 2018; TONUCCI *et al.*, 2017; TSILIKA *et al.*, 2022).

Portanto, seu efeito probiótico pode ser associado a alimentos, ainda mais que esta espécie apresenta boa adaptação em matrizes alimentícias, especialmente em produtos lácteos, quando sua atividade metabólica resulta na produção de sabor e aroma que causam propriedades organolépticas especiais, inibem bactérias deterioradoras de alimentos e também existem relatos do efeito antagonista a patógenos (PARVANEH; MARYAM, 2011).

O desafio para se ter um alimento probiótico está em preservar a viabilidade das células ao final da vida de prateleira. Na literatura científica evidenciam contagens insuficientes de probióticos viáveis, conforme definido por $< 10^6$ UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ antes da data de validade, diminuindo assim os potenciais benefícios à saúde conferidos por esses produtos (NG; YEUNG; TONG, 2011).

Este desafio pode estar relacionado a fatores como a interação entre as culturas microbianas, visto que culturas iniciadoras do iogurte, em especial, *Streptococcus thermophilus* é relacionada com a redução do potencial probiótico de algumas cepas (TERPOU *et al.*, 2017). Também a fatores como as condições de processamento e armazenamento, incluindo acidez, pH, temperatura, níveis de oxigênio e outros fatores que afetam a sobrevivência de cepas probióticas (NYANZI; JOOSTE; BUYS, 2021).

Cabe à ciência, bem como a tecnologia de alimentos buscar formas de contornar estes desafios, assim, estudos já apontam técnicas de potencializar cepas probióticas, como imobilização celular, encapsulamento, adição de prebióticos. Ainda, as tecnologias emergentes também estão sendo aplicadas como estratégias para otimizar a viabilidade probiótica como alta pressão, campo elétrico pulsado, uso da irradiação UV e o ultrassom de alta intensidade HIUS.

NIAMAH, 2019 desenvolveu um leite fermentado com diferentes bactérias ácido lácticas (BAL) e encontraram resultados que demonstram que o HIUS aumentou o número de células viáveis em 5% das cepas, uma delas o *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) e a atividade da enzima β -galactosidase que é responsável pela conversão da lactose em ácido lático também.

CAPÍTULO II

As ondas de ultrassom normalmente são formadas pelos transdutores, elas percorrem através da matriz ou sobre sua superfície em uma velocidade dependente da frequência, potência e amplitude, bem como da natureza da matriz propagada, que quando líquida é muitas vezes atribuída ao fenômeno da cavitação (MUÑOZ *et al.*, 2021).

Em outras palavras, seria o processo de crescimento e encolhimento alternado, por meio do surgimento de microbolhas propagadas ao longo da matriz, que se expandem durante os ciclos do HIUS. Este processo é causador da ruptura de estruturas, desta forma, aumenta-se a temperatura e pressão, que por consequência geram inúmeras novas ondas (LENTACKER; DE COCK; *et al.*, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2021).

Todo este fenômeno pode causar forças de cisalhamentos, rupturas, ou efeitos não destrutíveis, como a sonoporação (KÖRZENDÖRFER *et al.*, 2019). Logo, estes efeitos nas células de micro-organismos podem melhorar a transferência de massa, pela melhoria na permeabilidade da membrana celular. Também facilitar reações enzimáticas, contribuir para a remoção de subprodutos de células metabolismo e, assim, melhorar o crescimento com a redução do tempo de fermentação (OJHA *et al.*, 2017b).

Os benefícios da utilização de HIUS sob a modulação microbiana dependem de fatores como as propriedades físicas, biológicas ou morfológicas dos micro-organismos: cinética de cada célula, fase de crescimento, tamanho e espessura da cápsula, bem como os parâmetros de processo: potência, frequência, amplitude, volume da amostra, tempo de sonicação, pressão, temperatura e volume do inóculo (ABESINGHE *et al.*, 2019).

Portanto, a fim de melhor compreender o efeito do HIUS em uma matriz alimentícia popular e muitas vezes veículo de probióticos, este estudo tem por objetivo utilizar diferentes e diferentes configurações de equipamentos de ultrassom para se verificar sua influência no tempo de fermentação, nas características físico-químicas e na viabilidade microbiana em diferentes leites fermentados.

CAPÍTULO II

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Setor de Higiene, Microbiologia e Toxicologia de Alimentos, nos Laboratórios de Microbiologia Industrial e Biocatálise e Microbiologia de Processos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Também na Escola de Engenharia da UFMG, no laboratório de Resíduos Agroindustriais, no Departamento da Engenharia Mecânica da UFMG.

2.2.1 Material

Todos os ingredientes necessários para o desenvolvimento dos leites fermentados (leite integral pasteurizado, açúcar e leite em pó) foram adquiridos no comércio local de Belo Horizonte – MG.

2.2.1.1 Culturas microbianas

A cultura liofilizada mista tradicional do iogurte utilizada foi a Yo-Flex[®] L 903 (Christian Hansen), de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adquirida na empresa Macalé Produtos de Laboratório LTDA.

A cultura pura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5[®], Chr. Hansen), utilizada pertence ao estoque microbiológico do laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise do Departamento de Alimentos (Faculdade de Farmácia, UFMG), trata-se de uma doação feita pelo Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Todas as culturas utilizadas estavam estocadas a -18°C até o momento em que foram utilizadas.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Padronização do inóculo da cultura de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, para elaboração dos leites fermentados

A linhagem probiótica liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, inicialmente foi cultivada no meio MRS (Man, Rogosa & Sharpe, Acumedia, Lansing, MI, EUA) com 0,05% de cisteína-L Cloridrato H₂O P.A (Synth) a 37°C em 24 horas (5 gramas em 100 mL de caldo MRS) em condições de microaerofilia (ABESINGHE *et al*, 2019). Após o período de incubação, 1 mL da cultura foi congelada a -80 °C em tubos de 1,5 mL contendo 25% de glicerol.

CAPÍTULO II

Conforme a metodologia realizada por BERNUCCI *et al.*, 2017 adaptada, para padronizar o inóculo de estoque a ser utilizado durante o experimento, a uma concentração mais alta de células, com no mínimo 9 Log UFC.mL⁻¹, três ativações consecutivas dos micro-organismos foram feitas. Primeiramente transferiu-se 1 mL (da cultura congelada em tubos de 1,5 mL a -18°C) em 10 mL de caldo MRS por 24 horas à 37 °C em condições de microaerofilia, elevando-se a escala em 20 e 300 mL de caldo MRS nas 48 e 72 horas posteriores.

Após a incubação, a cultura foi centrifugada (centrífuga de laboratório refrigerada novatecnica NT825) por 15 minutos à 2.792 x.g, e o sobrenadante foi removido cuidadosamente, adicionado de 5 mL de água destilada estéril ao concentrado de células, centrifugado outra vez por 15 minutos, para novamente se remover o sobrenadante e se adicionar 10 mL de caldo MRS (BERNUCCI *et al.*, 2017, adaptada).

O concentrado de células ressuspendido foi distribuído em *eppendorfs* de 1,5 mL, da seguinte maneira: 1 mL de inóculo mais 25% de glicerol (70%), cada *eppendorf* foi identificado e estocado a -80 °C. Uma alíquota deste concentrado de células padronizado foi deixada para se confirmar a morfologia das células por microscopia, por coloração de Gram e o número de células viáveis, ele precisaria ser maior que 9 Log UFC.mL⁻¹, a diluição e o plaqueamento foram realizados pela metodologia de micro-gota (COELI, 2020; WEAVER *et al.*, 1991)

Em seguida, realizou-se a diluição decimal seriada até 10⁻⁸, uma alíquota de 100 µL foi transferida para 900 µL de água peptonada com ágar (0,1% de peptona e 0,1% de ágar bacteriológico) estéril, seguindo para homogeneização. As diluições de 10⁻⁵ a 10⁻⁸ foram plaqueadas em micro-gotas de 10 µL em meio MRS e incubadas a 37 °C por 72 horas, com a adição de sobre-camada de ágar bacteriológico 2%, conferindo uma condição de anaerobiose. Finalmente verificou-se as contagens do número de unidades formadoras de colônias (UFC) típicas de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 por mililitros UFC.mL⁻¹ (VIEIRA, 2017; WEAVER *et al.*, 1991).

2.2.2.2 Ativação da cultura de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, para elaboração dos leites fermentados

A cultura padronizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 foi descongelada e ativada para ser adicionada aos leites fermentados, passando um 1 mL para 10 mL de caldo MRS estéril, incubado por 24 horas a 37 °C. Este volume então foi transferido para 100 mL de caldo MRS estéril novamente e incubado por mais 24 horas a 37 °C. Após este período, a caldo cultivado foi centrifugado por 10 minutos à 2.792 x g. O sobrenadante foi removido e à massa de células

CAPÍTULO II

foram adicionados a 5 mL de água destilada estéril e realizada uma nova centrifugação por 10 minutos à 2.792 x g. Descartou-se o sobrenadante e se adicionou 5 mL de água peptonada (0,1 %) constituindo o inóculo (BERNUCCI *et al.*, 2017).

Finalmente, foram adicionados 4% da cultura ativada nas formulações dos leites fermentados (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009). A concentração da cultura microbiológica adicionada ao leite para fermentação foi determinada para se confirmar no mínimo 8 Log UFC.mL⁻¹ do inóculo preparado.

2.2.2.3 Preparo da cultura liofilizada Yo-Flex® L 903 (Christian Hansen), de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

A cultura mista termofílica de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foram preparadas no esquema de inoculação direta, diluindo assepticamente o conteúdo de 1 g em 100 mL de leite desnatado UHT reconstituindo a 10% (p/v) (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2012)

Então, 2% deste inóculo foi inserido às formulações dos leites fermentados, antes se realizou a contagem de células viáveis a fim de se confirmar no mínimo 8 Log UFC.mL⁻¹ (FATIMA D' ANGELIS, 2020).

2.2.2.4 Preparo das formulações de leites fermentados

As formulações de leite fermentado foram preparadas para se adicionar cada inóculo de micro-organismos ativados, representados como Leite Fermentado (LF) I, II e III, na **Tabela 2.1**. Para tal, o volume de leite fermentado necessário para as amostras foi estimado, e assim se definiu o conteúdo de leite integral pasteurizado necessário, deste foi acrescido 8% de açúcar e 3% de leite em pó desnatado. O leite em pó foi incluído à formulação para se elevar o teor de sólidos totais e produzir uma bebida mais consistente. Os ingredientes foram todos homogeneizados e o conteúdo foi distribuído em tubos Falcon, contendo 40 mL cada, que seguiram para a pasteurização a 95°C por 5 minutos, sendo imediatamente resfriados a 4°C para adição dos inóculos e posterior uso de HIUS (HASANI *et al.*, 2017; HASANI; KHODADADI; HESHMATI, 2016).

CAPÍTULO II

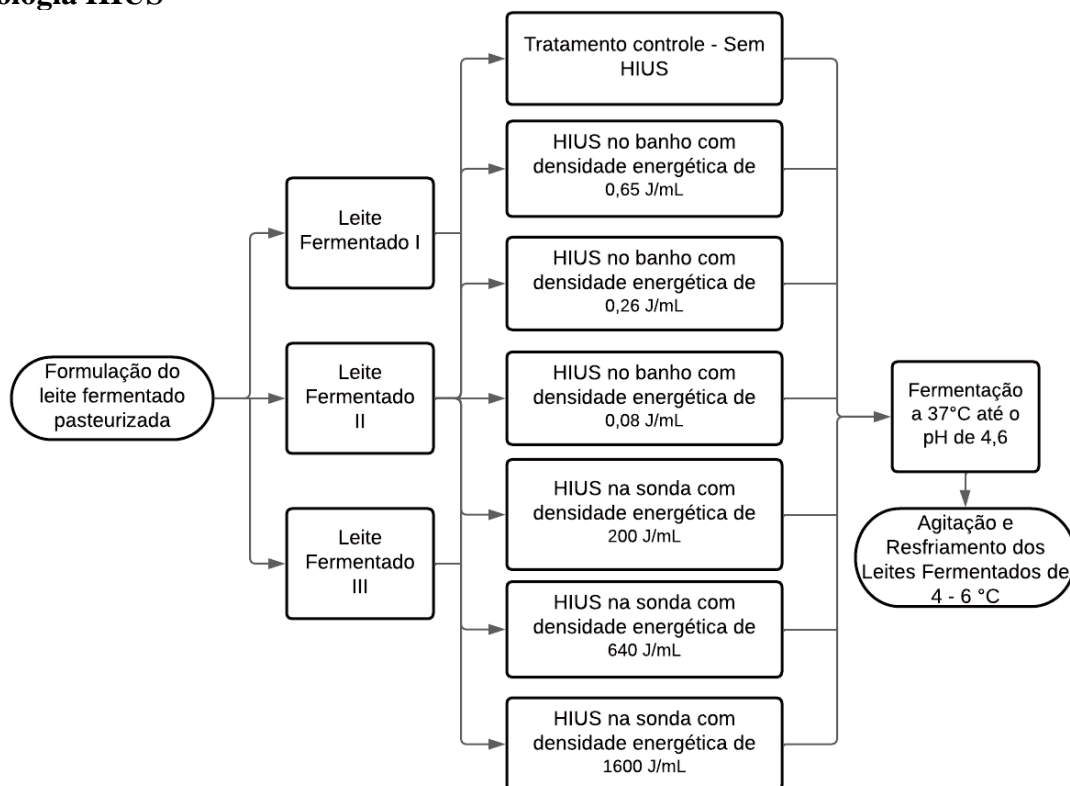
TABELA 2.1- Leites Fermentados distribuídos em 3 formulações, de acordo com as culturas adicionadas

Leite Fermentado	2% v/v da cultura iniciadora	4% v/v da cultura iniciadora
I	<i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	*
II	<i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5
III	**	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5

*No Leite Fermentado I não será adicionado cultura probiótica; **No Leite Fermentado III não será adicionado cultura do iogurte.

2.2.2.5 Tratamento de HIUS

As amostras de 40 mL foram adicionadas aos seus inóculos de micro-organismos de cada formulação de leite fermentado, a temperatura das amostras foram mantidas abaixo de 4 °C e conduzidas à submissão dos tratamentos ilustrados na **Figura 2.1**.

FIGURA 2.1- Fluxograma dos leites fermentados que serão elaborados com e sem a tecnologia HIUS

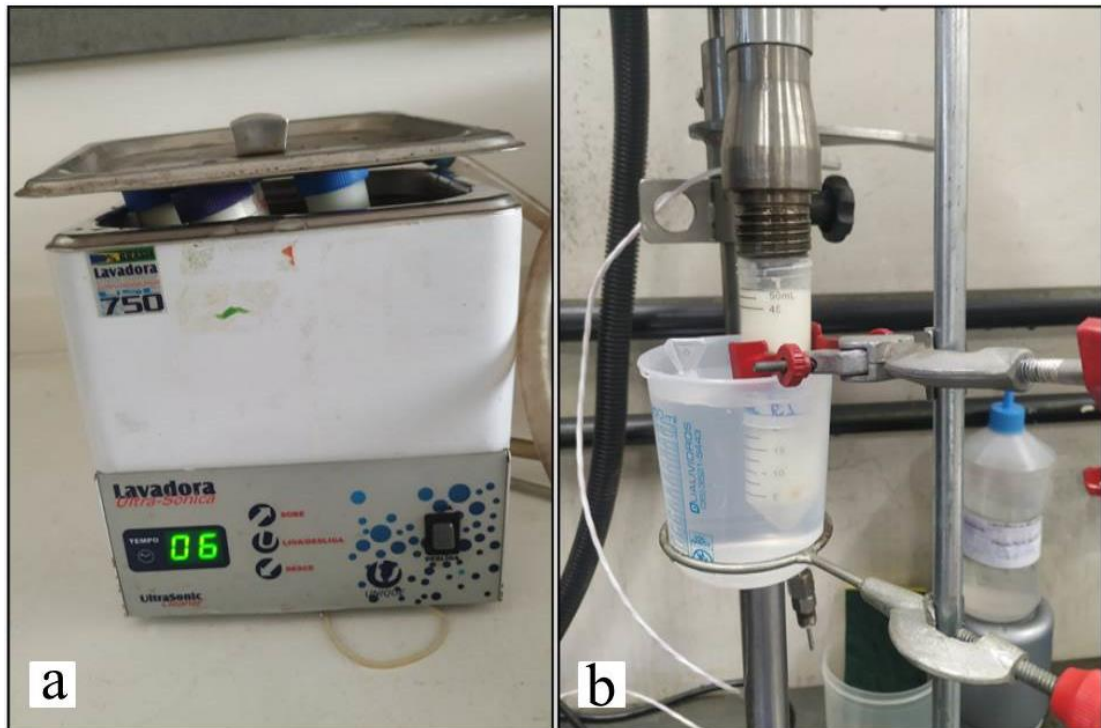
Fonte: dados de pesquisa.

Notas: a formulação do Leite Fermentado I foi adicionada só à cultura tradicional do iogurte. A formulação do LF II, à cultura do iogurte + a probiótica e a do III só à cultura probiótica.

CAPÍTULO II

Os tratamentos de HIUS ilustrados foram aplicados por diferentes equipamentos: banho ultrassônico e uma sonda de ultrassom. Além disso, temperaturas distintas das amostras durante esta etapa foram testadas: 10 e 25°C, para tal os tubos Falcon contendo os leites fermentados foram sonicados submersos em banho com temperatura controlada (FIG. 2.2).

FIGURA 2.2 Amostras de formulações de leite fermentado sendo sonicadas por diferentes equipamentos de HIUS



Fonte: dados de pesquisa; a) banho ultrassônico com amostra sonicada submersa em água a temperatura de 10 ou 25°C; b) Sonotrodo de ultrassom inserido na amostra sonicada submersa em água a temperatura de 10 ou 25°C;

As densidades energéticas (DE) de HIUS foram definidas para este experimento, baseando-se em revisão da literatura científica sobre alimentos contendo bactérias ácido lácticas (BAL), que tiveram modulação microbiana com o HIUS. Para se ajustar as condições dos equipamentos utilizados no experimento a **Equação 1**, utilizada para se determinar a DE, permitiu se encontrar a duração da sonicação das amostras, em detrimento de uma potência e volume específico, os tubos continha 40 mL de mistura de ingredientes do leite fermentado pasteurizado, mas o volume do inóculo das culturas iniciadoras variou de formulação para formulação (GUIMARÃES; SILVA; *et al.*, 2018).

Equação 1:

$$DE (J/mL) = \frac{\text{Potência Nominal (W)} \times \text{Tempo de Processo (s)}}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

CAPÍTULO II

2.2.2.6 Tratamento de HIUS em banho ultrassônico

Para tratamento com HIUS, o banho ultrassônico Unique (modelo USC 750, Brasil; 100 W, 25 kHz) com capacidade de 1,850 L foi usado. Neste equipamento, o volume deve ser considerado da amostra e do líquido que preenche (água) o banho em que as ondas perpassam para se definir as densidades energéticas.

O aparelho foi ajustado com potência de 100 W, a água preencheu um volume de 1.500 mL do banho e 4 amostras dos leites fermentados foram colocadas neste banho, logo, um volume de 1.660 mL (água do banho + volume das amostras das formulações dos leites fermentados) acrescido dos inóculos de cada leite fermentado foi sonicado.

O Leite Fermentado I (só com a cultura iniciadora tradicional do iogurte) teve um volume final da amostra de 1.668 mL e a duração da aplicação de ultrassom dependeu da densidade energética aplicada, de acordo com a **Tabela 2.2**.

TABELA 2.2 - Duração da aplicação de ultrassom em banho ultrassônico do Leite Fermentado I

Densidade energética	Duração
0,08 J.mL ⁻¹	1 minuto e 21 segundos
0,26 J.mL ⁻¹	4 minutos e 21 segundos
0,65 J.mL ⁻¹	10 minutos e 53 segundos

Fonte: Dados de Pesquisa

Enquanto o Leite Fermentado II obteve o volume final sonicado de 1.500 mL de água do banho + 169,6 mL de 4 amostras das formulações dos leites fermentados e os seus respectivos inóculos, que eram formados da cultura mista do iogurte com a cultura probiótica de *L. acidophilus* La-5. A duração da aplicação de ultrassom dependeu da densidade energética aplicada, de acordo com a **Tabela 2.3**.

TABELA 2.3- Duração da aplicação de ultrassom em banho ultrassônico do Leite Fermentado II

Densidade energética	Duração
0,08 J.mL ⁻¹	1 minuto e 25 segundos
0,26 J.mL ⁻¹	4 minutos e 31 segundos
0,65 J.mL ⁻¹	11 minutos e 18 segundos

Fonte: Dados de Pesquisa

Já o Leite Fermentado III (só com a cultura iniciadora probiótica) obteve o volume final sonicado de 1.500 mL de água do banho + 166,4 mL de 4 amostras das formulações dos leites

CAPÍTULO II

fermentados e os seus respectivos inóculos, *L. acidophilus* La-5. A duração da aplicação de ultrassom dependeu da densidade energética aplicada, de acordo com a **Tabela 2.4**.

TABELA 2.4 - Duração da aplicação de ultrassom em banho ultrassônico do Leite Fermentado III

Densidade energética	Duração
0,08 J.mL ⁻¹	1 minuto e 23 segundos
0,26 J.mL ⁻¹	4 minutos e 26 segundos
0,65 J.mL ⁻¹	11 minutos e 6 segundos

Fonte: Dados de Pesquisa

As amostras sonicadas no banho, com densidades energéticas de 0,65, 0,26 e J.mL⁻¹, promoveram os respectivos incrementos de 5, 4 e 2 °C na temperatura do banho ajustado previamente a 25 °C e de 2, 1 e 1 °C no banho ajustado a 10 °C.

2.2.2.7 Tratamento de HIUS em sonotrodo

O tratamento com HIUS usando sonda ocorreu no equipamento Ultronique (modelo QR 500, Brasil; 500 W, 20 kHz), com macroponteira de espessura de 10 mm e comprimento de 64 mm. A sonda de US foi colocada a aproximadamente 48 mm da superfície da amostra em tubos Falcon.

A amplitude do aparelho foi ajustada de acordo com a densidade energética escolhida para cada tratamento, baseada em valores encontrados na literatura científica. Neste aparelho, o tempo de sonicação deveria ser em números inteiros, em minutos, logo, para se sonicar um mesmo volume em densidades diferentes, em minutos, diferentes amplitudes foram utilizadas.

O Leite Fermentado I (só com a cultura iniciadora tradicional do iogurte) teve um volume final da amostra de 40,8 mL, assim, as condições foram ajustadas de acordo com a **Tabela 2.5**.

TABELA 2.5- Duração e Potência Nominal da aplicação de ultrassom com sonotrodo do Leite Fermentado I

Densidade energética	Potência Nominal	Duração
200 J.mL ⁻¹	136 W	1 minuto
640 J.mL ⁻¹	435 W	1 minutos
1600 J.mL ⁻¹	363 W	3 minutos

Fonte: Dados de Pesquisa

CAPÍTULO II

Enquanto o Leite Fermentado II com o volume final da amostra de 42,4 mL (ingredientes do leite fermentado + cultura mista do iogurte + cultura probiótica) teve as condições do equipamento de HIUS ajustados de acordo com a **Tabela 2.6**.

TABELA 2.6- Duração e Potência Nominal da aplicação de ultrassom com sonotrodo do Leite Fermentado II

Densidade energética	Potência Nominal	Duração
200 J.mL ⁻¹	141 W	1 minuto
640 J.mL ⁻¹	452 W	1 minutos
1600 J.mL ⁻¹	377 W	3 minutos

Fonte: Dados de Pesquisa

E o Leite Fermentado III, só com a cultura iniciadora probiótica (com volume final da amostra de 41,6 mL) teve os parâmetros ajustado de acordo com a **Tabela 2.7**.

TABELA 2.7- Duração e Potência Nominal da aplicação de ultrassom com sonotrodo do Leite Fermentado III

Densidade energética	Potência Nominal	Duração
200 J.mL ⁻¹	139 W	1 minuto
640 J.mL ⁻¹	444 W	1 minutos
1600 J.mL ⁻¹	370 W	3 minutos

Fonte: Dados de Pesquisa

As amostras sonicadas na sonda, com densidades energéticas de 1600, 640 e 200 J.mL⁻¹, promoveram os respectivos incrementos de 35, 21 e 15 °C na temperatura do banho que a amostra estava submersa ajustado previamente a 25 °C e de 25, 16 e 7 °C no banho ajustado a 10 °C.

2.2.2.8 Fermentação

Após a aplicação de todos tratamentos as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo (< 4 °C), exceto o tratamento controle (já mantido a esta temperatura), para que voltassem a temperatura de refrigeração. Assim, enquanto cada procedimento de HIUS era realizado, as amostras já sonicadas e resfriadas previamente em banho de gelo eram mantidas sob refrigeração. A fim de que a fermentação se iniciasse concomitantemente aos demais tratamento.

A etapa de sonicação foi realizada em menor tempo hábil possível, após ela a fermentação ocorreu por meio da incubação das amostras a 37 °C em estufa tipo B.O.D.,

CAPÍTULO II

monitorada com análise de pH durante processo e interrompida após os leites fermentados atingirem pH de 4,5 (FATIMA D' ANGELIS, 2020; WANG *et al*, 2019).

A partir de então, o tempo final de fermentação de cada leite fermentado, submetido a diferentes tratamentos foi registrado e os leites fermentados foram agitados para quebra do gel e refrigerados (<4 °C) até o momento das análises.

2.2.2.7 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e as amostras de leites fermentados, de todas as formulações e seus respectivos tratamentos foram realizadas em três repetições.

2.2.2.8 Avaliação da vida útil das formulações de leites fermentados

Após o preparo, todas as amostras foram submetidas a análises físico-químicas e microbiológicas, imediatamente após a fermentação, bem como ao final de 28 dias de estocagem refrigerada (<4 °C).

2.2.2.9 pH e Acidez Total Titulável

A aferição do pH nas amostras ocorreu conforme a metodologia AOAC, 2019, com a utilização do pHmetro MS TecnoPON[®].

A técnica de titulometria foi realizada para se determinar a acidez total, em que a titulação foi executada com a solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ sob 10 g das amostras de LF, adicionadas de 10 mL de água destilada e 3 gotas do indicador fenolftaleína a 1%, até que o ponto de viragem fosse identificado com apoio de pHmetro até pH de 8,3. Assim, o titulável foi verificado e com o apoio da Equação 2, o percentual de ácido láctico na amostra foi determinado (AOAC, 2019).

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,09 \times N \times 100}{M}$$

Em que,

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ gasto na titulação, em mL;

M = Massa da amostra, em gramas;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,09 = fator de conversão do ácido láctico;

CAPÍTULO II

N = normalidade de solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

2.2.2.10 Avaliação da viabilidade de bactérias ácido lácticas

Para os Leites Fermentados adicionados somente da cultura tradicional do iogurte, ou só com a cultura do *Lactobacillus acidophilus* LA-5 realizou-se o plaqueamento em meio MRS, enquanto as formulações adicionadas de cultura tradicional de iogurte e probiótica foram realizados dois plaqueamentos, um em meio MRS, determinando o conteúdo de bactérias ácido lácticas totais e outro em meio MRS seletivo só para *L. acidophilus* LA-5. Este meio foi o ágar MRS-Bile (contendo 0,5 g.L⁻¹ de sais biliares e 1% de cisteína), para avaliar sua seletividade na presença da cultura mista tradicional do iogurte (Yo-Flex® L 903) foram executados ensaios descritos por (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999) obtendo recuperação de 98,74% para *L. acidophilus* La-5 e inibição total da cultura Yo-Flex® L 903 (PEREIRA, 2012).

Antes do plaqueamento dos leites fermentados, a diluição decimal seriada até 10⁻⁷ foi executada, em micro-escala, através da metodologia de micro-gota. Inicialmente se homogeneizou as amostras de LF para se coletar 100 µL, transferiu para 900 µL de água peptonada com ágar (0,1% de peptona e 0,1% de ágar bacteriológico) estéril, e homogeneizou o frasco da primeira diluição decimal vigorosamente em vortex (Biomixer). Desta amostra, o procedimento foi replicado até uma concentração de 10⁻⁷ da alíquota inicial do LF inoculado (WEAVER *et al.*, 1991).

Assim, a diluições de 10⁻⁴ a 10⁻⁷ foram plaqueadas em micro-gotas de 10 µL no meio de cultura específico de cada formulação, como anteriormente mencionado e incubadas a 37 °C por 72 horas, com a adição de sobre-camada de ágar bacteriológico 2%, conferindo uma condição de anaerobiose. Para se quantificar o número de unidades formadoras de colônias típicas das bactérias ácido lácticas analisadas por mililitros (UFC.mL⁻¹) (VIEIRA, 2017; WEAVER *et al.*, 1991)

2.2.2.11 Análise estatística

As variáveis dependentes foram os dados como pH, acidez, tempo de fermentação e viabilidade microbiana dos leites fermentados com e sem HIUS. A partir delas se verificou as premissas de normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, os dados também serão submetidos a análise de variância com dois fatores (ANOVA *two-way*) e as médias comparadas pelo teste de Tukey no nível de probabilidade 0,05, utilizando o programa R.

CAPÍTULO II

2.2.2.12 Potencial de sobrevivência δ

Foi calculado a diferença entre as contagens final (fim do período de armazenamento, de 28 dias) e inicial (início do período de armazenamento), obteve-se então o potencial de crescimento (δ), valores negativos de $\delta \leq 0,5$ log na base 10 indicam que o leite fermentado não teve sobrevivência microbiologicamente significativa (MUNFORD *et al.*, 2017).

CAPÍTULO II

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**2.3.1 Tempo de fermentação**

O tempo de fermentação do LF I com aplicação de HIUS no banho ultrassônico teve maior duração, utilizando a densidade energética de $0,65 \text{ J.mL}^{-1}$, tanto com a amostra em banho de 10°C e 25°C . As outras DE aplicadas no banho ultrassônico (com temperaturas diferentes) não apresentaram diferença estatística entre si e o tratamento controle (**TAB. 2.8**). Assim, foi possível entender que o HIUS aplicado no banho, para o LF I, só com a cultura tradicional do iogurte, não apresentou redução do tempo de fermentação, sendo que um parâmetro ($0,65 \text{ J.mL}^{-1}$ a 10°C e a 25°C) ainda causou um atraso da fermentação e as temperaturas das amostras durante a sonicação também não impactaram o tratamento.

TABELA 2.8- Tempo gasto para que atingissem $\text{pH} < 4,60$ as amostras de LF I contendo somente cultura tradicional do iogurte

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Tempo (min)
Banho	10°C	$0,65 \text{ J.mL}^{-1}$	361.67 a
	25°C	$0,65 \text{ J.mL}^{-1}$	360.00 a
	25°C	$0,26 \text{ J.mL}^{-1}$	346.67 ab
-*	-*	Sem tratamento	345.00 b
Banho	25°C	$0,08 \text{ J.mL}^{-1}$	345.00 b
	10°C	$0,26 \text{ J.mL}^{-1}$	343.00 b
	10°C	$0,08 \text{ J.mL}^{-1}$	340.00 b
Sonda	10°C	1600 J.mL^{-1}	366.67 a
	25°C	1600 J.mL^{-1}	353.33 a
	-*	-*	Sem tratamento
Sonda	25°C	200 J.mL^{-1}	341.67 ab
	10°C	200 J.mL^{-1}	331.67 ab
	10°C	640 J.mL^{-1}	313.33 bc
	25°C	640 J.mL^{-1}	313.33 bc

* Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a, b e c) Médias seguida da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

Quando o HIUS foi aplicado nas amostras do LF I por sonda, observou-se também que a maior duração da fermentação foi com a densidade de 1600 J.mL^{-1} , desta vez, com um tempo

CAPÍTULO II

final de 366,67 minutos. Apesar disso, neste caso, a amostra tratada no equipamento HIUS de sonda com a densidade de 640 J.mL^{-1} a 10°C e 25°C tiveram os menores tempos de fermentação, de 313,33 minutos, adiantando esta etapa do processamento de iogurtes em 31,87 minutos em comparação com o tratamento controle (Sem HIUS).

Como as temperaturas de aplicação de HIUS não apresentaram diferença entre si, a temperatura de 25°C seria a mais indicada para o tratamento com DE de 640 J.mL^{-1} no LF só com a cultura tradicional do iogurte, visto que não necessitaria de aplicação de rede de frio durante a sonicação das amostras.

No cálculo da densidade energética se considera o volume da amostra, o tempo de duração do HIUS e a potência do mesmo, estudos que realizaram a aplicação de HIUS por tempos mais longos, em virtude da potência de seus equipamentos serem menores, observaram a dissipação do calor com incrementos da temperatura na amostra sonicada, e este calor pode causar a eliminação de células ao final no tratamento (HUANG *et al.*, 2019; NGUYEN; LEE; ZHOU, 2012). O que justifica a pesquisa do efeito de diferentes temperaturas das amostras sonicadas neste estudo.

Mas, o fato é que, a aplicação de HIUS na amostra com DE de 640 J.mL^{-1} no equipamento de sonda aumentou em 21°C a amostra que estava submersa ajustada previamente a 25°C e 16°C na amostra em banho ajustado a 10°C , ao final de 2 minutos de aplicação. Como o tempo de fermentação para elas não se diferiram, este aumento de temperatura não foi suficiente para causar prejuízo no metabolismo celular durante a fermentação.

O leite fermentado só com a cultura do iogurte apresentou um tempo de fermentação de 345 minutos, já o leite fermentado com a cultura tradicional do iogurte mais a cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La 5 foi de 271,67 minutos (**TAB. 2.9**), ambos os tempos em amostras controle (Sem HIUS), este decréscimo de tempo decorre do fato de se ter uma maior quantidade de micro-organismos fermentado esta matriz alimentícia (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

CAPÍTULO II

TABELA 2.9- Tempo gasto para que atingissem pH < 4,60 as amostras de LF II contendo cultura tradicional do iogurte + probiótica

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Tempo (min)
Banho	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	290.00 a
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	278.33 a
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	276.67 a
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	276.67 a
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	275.00 a
	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	271.67 a
	-*	Sem tratamento	271.67 a
Sonda	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	311.67 a
	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	308.33 a
	10 °C	640 J.mL ⁻¹	295.00 a
	25 °C	200 J.mL ⁻¹	295.00 a
	25 °C	640 J.mL ⁻¹	293.33 ab
	10 °C	200 J.mL ⁻¹	281.67 ab
-*	-*	Sem tratamento	271.67 bc

* Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a, b e c) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

No entanto, este leite fermentado em co-cultura tradicional do iogurte e probiótica (LF II) não apresentou influência estatisticamente significativa entre os tratamentos com HIUS em banho ultrassônico e sem HIUS. Enquanto com a sonda os tratamentos de 1600 e 640 J.mL⁻¹ a 10 e 25°C, bem como de 200 J.mL⁻¹ a 25°C causaram aumentos no tempo de fermentação estatisticamente significativos.

Então, no caso do Leite Fermentado II, nenhum dos tratamentos de HIUS aplicados seriam indicados para reduzir o tempo de fermentação. Ou, seria necessário estudos com a aplicação de outros parâmetros, intermediários, maiores ou menores do que os aplicados neste tipo de produto, para talvez, se observar a redução do tempo de fermentação. O LF I apresentou um tempo de fermentação de 345 minutos enquanto o LF II foi de 271,67 minutos e o LF III de 496,67 minutos (**TAB. 2.10**), todos eles provenientes das amostras controle (Sem HIUS).

CAPÍTULO II

O maior tempo gasto foi do leite fermentado só com a cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La 5, esta cepa tem seu metabolismo ótimo no pH entre 5,5 a 6,0, como o pH inicial do leite é em torno de 6,6, estes micro-organismos levam um tempo maior para realizar a acidificação inicial, assim a fermentação se torna mais lenta quando comparada à outras culturas, como a iniciadora do iogurte, que é muito rápida para fermentar o leite (SOUZA, 2014).

TABELA 2.10- Tempo gasto para que atingissem pH < 4,60 as amostras de LF III, contendo somente cultura probiótica

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Tempo (min)
Banho	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	513.33 a
	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	506.67 a
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	503.33 a
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	500.00 a
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	498.33 a
_*	_*	Sem tratamento	496.67 a
Banho	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	495.00 a
Sonda	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	506.33 a
	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	503.33 a
_*	_*	Sem tratamento	496.67 a
Sonda	25 °C	640 J.mL ⁻¹	493.33 a
	10 °C	640 J.mL ⁻¹	490.00 a
	10 °C	200 J.mL ⁻¹	481.67 a
	25 °C	200 J.mL ⁻¹	480.00 a

* Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

O maior tempo de fermentação do leite fermentado só com a cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La 5 foi 513,33 minutos, com a densidade de 0,65 J.mL⁻¹, no equipamento de banho, a 25°C, já o menor foi 480,00 minutos, observados no equipamento de sonda a 25°C com a densidade de 0,08 J.mL⁻¹. Este tempo foi 16,33 minutos a menos do que o observado na amostra controle, sem tratamento de HIUS, representa uma redução tecnologicamente interessante, visto que a fermentação é a etapa que consome mais tempo e recursos durante a fabricação de leites fermentados (POTOROKO *et al.*, 2018).

CAPÍTULO II

Talvez o parâmetro ainda possa ser melhor ajustado para se reduzir este tempo. NIAMAH, 2019 também observou que tempo de fermentação das amostras de leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* La 5 foi reduzido após HIUS com densidade energética de 208,8 J.mL⁻¹ com frequência de 40 kHz. Então, no caso do Leite Fermentado II, nenhum dos tratamentos de HIUS aplicados seriam indicados para reduzir o tempo de fermentação. Ou, seria necessário estudos com a aplicação de outros parâmetros, intermediários, maiores ou menores do que os aplicados neste tipo de produto, para talvez, se observar a redução do tempo de fermentação.

2.3.2 Viabilidade microbiana após tempo de estocagem

Os dados referentes ao *shelf life* dos leites fermentados I, II e III após 28 dias de armazenamento não tiveram diferenças significativamente estatísticas das contagens entre os tratamentos de HIUS sob diferentes temperaturas, densidades energéticas e equipamentos (TAB. 2.11 – 2.14).

TABELA 2.11- Viabilidade da cultura tradicional do iogurte (*Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) das amostras de LF I após 28 dias estocado <4°C

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Contagem (Após 28 dias) UFC.mL ⁻¹	δ* UFC.mL ⁻¹
Banho	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	7.84 ± 0.11*** a	- 0.35
	-**	Sem tratamento	7.73 ± 0.50 a	- 0.97
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	7.64 ± 0.24 a	- 0.59
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	7.58 ± 0.10 a	- 0.42
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	7.57 ± 0.13 a	- 0.63
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	7.54 ± 0.32 a	- 0.89
	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	7.50 ± 0.29 a	- 0.71
	Sonda	25 °C	640 J.mL ⁻¹	8.29 ± 0.14 a
10 °C		640 J.mL ⁻¹	8.29 ± 0.14 a	0.01
10 °C		200 J.mL ⁻¹	8.17 ± 0.13 a	- 0.05
25 °C		200 J.mL ⁻¹	8.17 ± 0.06 a	- 0.06
25 °C		1600 J.mL ⁻¹	7.80 ± 0.28 a	- 0.64
10 °C		1600 J.mL ⁻¹	7.75 ± 0.44 a	- 0.80
-**	-**	Sem tratamento	7.73 ± 0.50 a	- 0.97

* Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

** Tratamento controle, sem uso de HIUS;

*** Desvio padrão.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

CAPÍTULO II

Fonte: dados da pesquisa

A cultura tradicional do iogurte é composta por *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que não são relacionadas às alegações probióticas, logo, a viabilidade das mesmas não compromete o conteúdo funcional do produto, que também não pode ter a alegação de probiótico (BRASIL, 2018).

Sobretudo, o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leites fermentados estabelece que para ter denominação de iogurte no Brasil, o produto deve ter o mínimo estabelecido de $7 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, de bactérias ácido lácticas totais (BRASIL, 2007). Ou seja, o efeito do HIUS no iogurte reduziu seu tempo fermentação e preservou sua viabilidade durante o período de armazenamento sem comprometer a viabilidade mínima destas bactérias.

FERNANDES *et al*, 2016 desenvolveram um iogurte contendo 0,2% de café solúvel que apresentou um potencial de sobrevivência (δ) de -0,9 ao final de 28 dias de armazenamento, similar ao observado no leite fermentado desenvolvido só com a cultura tradicional do iogurte sem HIUS, todavia, as amostras sonicadas na sonda com DE de 600 J.mL^{-1} tanto a 10 quanto a 25°C apresentaram δ de 0 e 0,1.

Mesmo com a pós-acidificação proveniente da atividade continuada dos micro-organismos lácticos, mesmo sob refrigeração, principalmente dos *Lactobacillus*, a cultura tradicional no iogurte apresenta maior capacidade de tolerar ambientes ácidos e produzir ácido láctico, o que justificam o seu potencial de sobrevivência após o tempo de armazenamento (RECCHIA, 2015).

No que tange a quantidade mínima estabelecida para bactérias ácido lácticas pela legislação em leites cultivados ou fermentados, de $6 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, o LF II apresentou apenas valores superiores ao limite ao final do período de armazenamento de 28 dias (BRASIL, 2007).

Ainda não existem relatos da aplicação de HIUS em co-cultura tradicional do iogurte e probiótica com *Lactobacillus acidophilus* LA-5, neste estudo o tratamento de HIUS com as DE de 0,65, 0,26 e 0,08 J.mL^{-1} no banho e de 200, 640 e 1600 J.mL^{-1} na sonda, o LF II não apresentou efeito na viabilidade microbiana estatisticamente significativo ao final do armazenamento, quando comparado ao controle (sem HIUS), o que não justifica sua aplicação, visto que nem mesmo seu tempo de fermentação foi reduzido com a tecnologia.

TABELA 2.12- Viabilidade de bactérias ácido lácticas totais* das amostras de LF II após 28 dias estocado <math><4^{\circ}\text{C}</math>

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Contagem (Após 28 dias) UFC.mL ⁻¹	δ^* UFC.mL ⁻¹
Banho	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	9.18 ± 0.08 a	- 0.47
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	9.17 ± 0.06 a	- 0.40
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	9.12 ± 0.24 a	- 0.46
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	9.04 ± 0.23 a	- 0.57
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	8.98 ± 0.36 a	- 0.57
	-**	-**	Sem tratamento	8.93 ± 0.14 a
Banho	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	8.93 ± 0.13 a	- 0.73
Sonda	25 °C	200 J.mL ⁻¹	9.21 ± 0.04 a	- 0.79
	10 °C	200 J.mL ⁻¹	9.18 ± 0.29 a	- 0.64
	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	9.15 ± 0.12 a	- 0.55
	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	9.09 ± 0.26 a	- 0.52
	25 °C	640 J.mL ⁻¹	9.06 ± 0.21 a	- 0.59
	10 °C	640 J.mL ⁻¹	8.98 ± 0.33 a	- 0.66
	-**	-**	Sem tratamento	8.93 ± 0.14 a

*bactérias ácido lácticas totais: *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *Lactobacillus acidophilus* LA-5;

** Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

*** Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

Mas, talvez algum parâmetro não testado no presente estudo possa provocar o efeito neste leite fermentado como relatado por LIU, Wen Sin *et al*, 2018 da melhoria no desempenho da viabilidade de BAL em extrato hidrossolúvel de soja.

Encontrar a condição adequada se esbarra na linha tênue das múltiplas causas interferentes ao impacto do efeito do tratamento HIUS em diferentes produtos, como os parâmetros de processo, também propriedades físicas, biológicas ou morfológicas de cada micro-organismo (ABESINGHE *et al*, 2019).

Células maiores podem ser mais suscetíveis ao efeito da cavitação acústica, visto que possuem maiores superfícies de contato e células menores, como os cocos, que por sua vez podem ser mais resistentes do que bactérias em forma de bastonete (CHÁVEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

CAPÍTULO II

Desta forma, no caso deste leite fermentado elaborado com três micro-organismos diferentes *Streptococcus* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus* LA-5, cada propriedade morfológica pode-se ou não ser ajustada a um parâmetro, outros estudos podem aplicar parâmetros não testados nesse trabalho, a fim de se ajustar todos os fatores que interferem no processo.

Neste mesmo leite fermentado (LF II), a contagem de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 isoladamente também não apresentou valores de viabilidade o suficiente para apresentar diferenças ($p > 0,05$) com o controle, quando comparado ao controle (sem HIUS), com o HIUS aplicado sob diferentes DE no banho e na sonda. Mas também apresentou a quantidade mínima estabelecida para bactérias ácido lácticas em leites fermentados pela legislação, de 7 log UFC.mL⁻¹, ao final do período de armazenamento de 28 dias em todos tratamentos (BRASIL, 2007).

TABELA 2.13- Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 das amostras de LF II após 28 dias estocado <4°C

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Contagem (Após 28 dias) UFC.mL ⁻¹	δ^* UFC.mL ⁻¹
Banho	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	8.20 ± 0.19 a	- 0.81
	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	8.13 ± 0.81 a	- 0.68
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	8.01 ± 0.34 a	- 0.37
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	7.97 ± 0.26 a	- 0.58
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	7.86 ± 0.20 a	- 1.58
	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	7.65 ± 0.16 a	- 1,25
-**	-**	Sem tratamento	7.40 ± 0.17 a	- 0.83
Sonda	25 °C	200 J.mL ⁻¹	8.22 ± 0.73 a	- 0.14
	10 °C	200 J.mL ⁻¹	8.17 ± 0.81 a	- 0.37
	25 °C	640 J.mL ⁻¹	7.89 ± 0.23 a	- 0.85
	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	7.75 ± 0.20 a	- 0.97
	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	7.69 ± 0.05 a	- 0.88
	10 °C	640 J.mL ⁻¹	7.66 ± 0.11 a	- 1.04
-**	-**	Sem tratamento	7.40 ± 0.17 a	- 0.83

* Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

** Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

CAPÍTULO II

O leite fermentado contendo somente a cultura de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 não se diferiu de forma estatisticamente significativa ao final do armazenamento, com o HIUS aplicado sob DE de 200 J.mL⁻¹ na sonda, quando comparado ao controle (sem HIUS). Todavia apresentou uma diferença de 0,71 log UFC.mL⁻¹, também apresentou um potencial de sobrevivência maior em relação ao controle, que têm uma diferença microbiológica significativa, segundo (MUNFORD *et al.*, 2017) .

Além disso, a legislação brasileira não impõe uma quantidade mínima de cepas probióticas para garantirem uma alegação de leites fermentados probióticos, o Guia n° 21, 2021 orienta por uma instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos onde as empresas precisam apresentar laudos e estudos que comprovem que a quantidade do produto cumpra com o efeito da alegação.

TABELA 2.14- Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 das amostras de LF III

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	Contagem (Após 28 dias) UFC.mL ⁻¹	δ* UFC.mL ⁻¹
Banho	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	7.89 ± 0.69 a	- 0.67
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	7.86 ± 0.80 a	- 0.50
-**	-**	Sem tratamento	7.85 ± 0.58 a	- 0.77
Banho	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	7.75 ± 0.80 a	- 0.78
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	7.72 ± 0.85 a	- 0.44
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	7.68 ± 0.54 a	- 0.70
	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	7.68 ± 0.56 a	- 0.50
Sonda	25 °C	200 J.mL ⁻¹	8.56 ± 0.07 a	- 0. 17
	10 °C	200 J.mL ⁻¹	8.34 ± 0.11 a	- 0. 33
	25 °C	640 J.mL ⁻¹	8.22 ± 0.42 a	- 0. 23
	10 °C	640 J.mL ⁻¹	8.14 ± 0.15 a	- 0 .44
	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	7.88 ± 0.46 a	- 0 .87
-**	-**	Sem tratamento	7.85 ± 0.58 a	- 0.77
Sonda	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	7.80 ± 0.39 a	- 0.90

* Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

* Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguida da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

Os estudos desenvolvidos para determinar a dose probiótica eficaz no geral indica valores de 10⁸ a 10¹⁰ UFC diárias (ALBADRAN *et al.*, 2015). Sob esta perspectiva, as amostras

CAPÍTULO II

do leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 sob a tecnologia de HIUS aplicado com DE de 200 e 640 J.mL⁻¹ a 10°C e a 25°C na sonda.

2.3.3 Efeito da estocagem de 28 dias dos leites fermentados no pH e acidez

Todos os leites foram fermentados até um pH comum, logo o pH e a acidez inicial foram até pH ≤ 4,6, e após 28 dias de armazenamento o pH e acidez de todas amostras não se diferiram significativamente na análise estatística (TAB. 2.15 – 2.17).

TABELA 2.15- pH e acidez (g de ácido láctico/100 g) das amostras de LF I após 28 dias estocado <4°C

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	pH	Acidez
Banho	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	4.38 ± 0.11 a	0.94 ± 0.01 a
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	4.38 ± 0.20 a	0.89 ± 0.02 a
	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	4.38 ± 0.02 a	0.92 ± 0.10 a
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	4.36 ± 0.10 a	0.94 ± 0.19 a
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	4.36 ± 0.06 a	0.92 ± 0.09 a
	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	4.35 ± 0.02 a	0.88 ± 0.07 a
-**	-**	Sem tratamento	4.33 ± 0.01 a	0.90 ± 0.22 a
Sonda	10 °C	200 J.mL ⁻¹	4.41 ± 0.03 a	0.88 ± 0.10 a
	25 °C	200 J.mL ⁻¹	4.37 ± 0.01 a	0.92 ± 0.20 a
	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	4.36 ± 0.08 a	0.88 ± 0.20 a
-**	-**	Sem tratamento	4.33 ± 0.01 a	0.90 ± 0.22 a
Sonda	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	4.33 ± 0.02 a	0.87 ± 0.10 a
	10 °C	640 J.mL ⁻¹	4.32 ± 0.02 a	0.87 ± 0.10 a
	25 °C	640 J.mL ⁻¹	4.31 ± 0.06 a	0.89 ± 0.20 a

* Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

** Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

Embora tenha sido verificado pós acidificação nos leites fermentados durante a vida útil, os valores de acidez se mantiveram dentro do padrão de identidade e qualidade impostos para iogurtes de 0,6 a 1,5 em todos tratamentos após 28 dias de armazenamento (BRASIL, 2007).

O teor de acidez, bem como o valor de pH são parâmetros importantes em leites fermentados, porque podem afetar na aceitabilidade e na viabilidade de culturas probióticas presentes, devendo-se manter estáveis ao longo do período de armazenamento sob refrigeração

CAPÍTULO II

(PIMENTEL *et al.*, 2015; VOGADO *et al.*, 2018). A legislação brasileira não recomenda valores de pH para iogurtes, sobretudo, BATISTA *et al.* (2017) aponta que pH é um parâmetro relevante em iogurtes por refletir no sabor, sendo ideal valores próximos de 4,4 (FATIMA D' ANGELIS, 2020).

TABELA 2.16- pH e acidez (g de ácido láctico/100 g) das amostras de LF II após 28 dias estocado <4°C

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	pH	Acidez
Banho	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	4.43 ± 0.05 a	0.87 ± 0.03 a
	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	4.42 ± 0.02 a	0.86 ± 0.07 a
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	4.39 ± 0.02 a	0.87 ± 0.02 a
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	4.39 ± 0.01 a	0.86 ± 0.02 a
-**	-**	Sem tratamento	4.38 ± 0,03 a	0.92 ± 0.07 a
Banho	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	4.36 ± 0.07 a	0.90 ± 0.09 a
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	4.36 ± 0.01 a	0.87 ± 0.02 a
Sonda	10 °C	200 J.mL ⁻¹	4.44 ± 0.04 a	0.88 ± 0.01 a
	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	4.40 ± 0.09 a	0.92 ± 0.03 a
	25 °C	1600 J.mL ⁻¹	4.40 ± 0.03 a	0.93 ± 0.02 a
	25 °C	200 J.mL ⁻¹	4.39 ± 0.03 a	0.89 ± 0.01 a
	25 °C	640 J.mL ⁻¹	4.38 ± 0.04 a	0.92 ± 0.02 a
	-**	-**	Sem tratamento	4.38 ± 0.03 a
Sonda	10 °C	640 J.mL ⁻¹	4.37 ± 0.10 a	0.91 ± 0.05 a

*bactérias ácido lácticas totais: *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *Lactobacillus acidophilus* LA-5;

** Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

*** Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

Desta forma, como todos os valores pH encontrados foram menores que 4,41, os sabores de todos os iogurtes elaborados podem ter sido impactados. A pós acidificação dos leites fermentados durante o período de estocagem ocorre porque as bactérias vivas no produto continuam usando lactose para produzir ácido, YUE *et al.*, 2022 avaliaram as mudanças de pH e acidez de 4 cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* no leite fermentado durante o armazenamento e determinaram a sequência completa do genoma das cepas, observaram que a *L. bulgaricus* KLDS1.1011 apresentou níveis reduzidos de acidez comparadas às demais.

CAPÍTULO II

Os valores de pH do leite fermentado com a cultura tradicional do iogurte e *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ficaram entre 4,44 e 4,36, enquanto de acidez (g de ácido láctico/100 g) entre 0,93 e 0,86 resultados semelhantes foram citados por CUI *et al*, 2021 e ELSANHOTY e RAMADAN, 2018.

TABELA 2.17- pH e acidez (g de ácido láctico/100 g) das amostras de LF III

Equipamento de HIUS	Temperatura de sonicação	Tratamento HIUS	pH	Acidez
-**	-**	Sem tratamento	4.43 ± 0.10 a	0.97 ± 0.30 a
Banho	10 °C	0,65 J.mL ⁻¹	4.33 ± 0.14 a	0.93 ± 0.07 a
	25 °C	0,08 J.mL ⁻¹	4.29 ± 0.05 a	0.93 ± 0.04 a
	10 °C	0,26 J.mL ⁻¹	4.27 ± 0.06 a	0.93 ± 0.05 a
	25 °C	0,65 J.mL ⁻¹	4.25 ± 0.01 a	0.93 ± 0.02 a
	25 °C	0,26 J.mL ⁻¹	4.24 ± 0.03 a	0.96 ± 0.02 a
	10 °C	0,08 J.mL ⁻¹	4.23 ± 0.02 a	0.96 ± 0.06 a
	Sonda	10 °C	1600 J.mL ⁻¹	4.45 ± 0.03 a
25 °C		1600 J.mL ⁻¹	4.45 ± 0.04 a	0.91 ± 0.07 a
10 °C		640 J.mL ⁻¹	4.44 ± 0.20 a	0.93 ± 0.06 a
25 °C		640 J.mL ⁻¹	4.44 ± 0.30 a	0.96 ± 0.03 a
-**	-**	Sem tratamento	4.43 ± 0.10 a	0.97 ± 0.30 a
Sonda	10 °C	200 J.mL ⁻¹	4.42 ± 0.01 a	0.93 ± 0.05 a
	25 °C	200 J.mL ⁻¹	4.39 ± 0.07 a	0.92 ± 0.04 a

* Contagem após 28 dias de estocagem do LF menos a contagem logo após o preparo do LF;

* Tratamento controle, sem uso de HIUS.

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Fonte: dados da pesquisa

Ao passo que o leite fermentado só com *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obteve em todos tratamentos após 28 dias de armazenamento valores de pH entre 4,45 e 4,23 e acidez (g de ácido láctico/100 g) entre 0,97 e 0,92, esta se manteve dentro do padrão de identidade e qualidade impostos para leite fermentado ou cultivado de 0,6 a 2 g de ácido láctico/100 g (BRASIL, 2007).

2.4 CONCLUSÃO

A aplicação de HIUS em diferentes densidades energéticas e temperaturas no banho ultrassônico não apresentou alteração no tempo de fermentação dos diferentes leites fermentados testados, nem na viabilidade microbiana bem como também não causou influência nos parâmetros físico-químicos. O tratamento de HIUS promoveu a redução no tempo de fermentação de amostras do leite fermentado só com a cultura tradicional do iogurte utilizando a sonda com a densidade de 640 J.mL^{-1} a 10°C e 25°C . Também reduziu o tempo de fermentação do leite fermentado só com a cultura *Lactobacillus acidophilus* LA-5 com o HIUS aplicado pela sonda com a densidade de 200 J.mL^{-1} a 10°C e 25°C . O leite fermentado com a co-cultura do iogurte e a probiótica teve seu tempo de fermentação aumentado com o HIUS na sonda. As temperaturas de aplicação de HIUS não apresentaram diferença entre si, assim a temperatura de 25°C seria a mais indicada para o tratamento HIUS utilizando sonda.

REFERÊNCIAS

ABESINGHE, A. M.N.L. *et al.* Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 90, p. 1–14, 1 mar. 2019.

ALBADRAN, Hanady A. *et al.* Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, v. 74, p. 208–216, 1 ago. 2015.

ANTONOPOULOU, Smaragdi *et al.* Consumption of yogurt enriched with polar lipids from olive oil by-products reduces platelet sensitivity against platelet activating factor and inflammatory indices: A randomized, double-blind clinical trial. **Human Nutrition & Metabolism**, v. 28, p. 200145, 1 jun. 2022.

BARTH R. Andréia. **Seleção de uma cultura microbiana comercial para indústria de laticínios com baixa pós-acidificação e aumento de viscosidade em leites fermentados**. 2014. 33 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos). Universidade do Vale dos Sinos, São Leopoldo-RS, 2014.

BATISTA, A. L. D. *et al.* Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of functional foods**, v. 38, p. 242-250, 2017.

BERNUCCI, Beatriz S.P. *et al.* Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **LWT**, v. 80, p. 341–347, 1 jul. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde, 2019. Guia N° 21. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 46 de 23 de outubro de 2007. Aprova Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 24 de outubro de 2007, Seção 1, p. 5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada n° 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 de julho de 2018, Seção 1, p. 3.

CHÁVEZ-MARTÍNEZ, América *et al.* Low and High-Intensity Ultrasound in Dairy Products: Applications and Effects on Physicochemical and Microbiological Quality. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1688, 18 nov. 2020.

CHOU, Lan Szu; WEIMER, Bart. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 1, p. 23–31, 1 jan. 1999.

CAPÍTULO II

COELI, C. R., Ana Luiza. **Bebida fermentada com potencial probiótico à base de extrato hidrossolúvel de soja com adição de grumixama (*Eugenia brasilienses*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) 50 p. - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2020.

CUI, Li; CHANG, Sam K.C.; NANNAPANENI, Rama. Comparative studies on the effect of probiotic additions on the physicochemical and microbiological properties of yoghurt made from soymilk and cow's milk during refrigeration storage (R2). **Food Control**, v. 119, p. 107474, 1 jan. 2021.

D' ANGELIS, F., Danielle. **Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de leites fermentados com potencial probiótico adicionados de farinhas integrais de sorgo irradiadas**. 2020. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2020.

DEL PIANO, M. *et al.* Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, n. SUPPL. 2, dez. 2006.

ELSANHOTY, Rafaat Mohamed; RAMADAN, Mohamed Fawzy. Changes in the physicochemical and microbiological properties of probiotic-fermented low-fat yoghurt enriched with barley β -glucan during cold storage. **Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka**, v. 68, n. 4, p. 295–309, 11 out. 2018.

FERNANDES, C. Ana Flávia *et al.* Vida de prateleira de iogurte sabor café. **SBI Biblioteca do Café**, v. 11, n. 4, p. 4, 2016.

GUIMARÃES, Jonas T.; SILVA, Eric Keven; *et al.* Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 44, p. 251–260, 1 jun. 2018.

HAJIFARAJI, Majid *et al.* Effect of probiotic supplements in women with gestational diabetes mellitus on inflammation and oxidative stress biomarkers: a randomized clinical trial. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 27, n. 3, p. 581–591, 1 mai. 2018.

HANSEN, L. Truelstrup *et al.* Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 35–45, 2002.

HASANI, Saber *et al.* Physicochemical and sensory attributes assessment of functional low-fat yogurt produced by incorporation of barley bran and *Lactobacillus acidophilus*. **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 4, p. 875–880, 1 jul. 2017.

HASANI, Saber; KHODADADI, Iraj; HESHMATI, Ali. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in rice bran-enriched stirred yoghurt and the physicochemical and sensory characteristics of product during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 2485–2492, 1 nov. 2016.

CAPÍTULO II

HELLER, Knut J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 374s–379s, 1 fev. 2001.

HESS, Julie; RAO, Goutham; SLAVIN, Joanne. The Nutrient Density of Snacks: A Comparison of Nutrient Profiles of Popular Snack Foods Using the Nutrient-Rich Foods Index. **Global Pediatric Health**, v. 4, 2017.

HUANG, Guoping *et al.* Stimulation of low intensity ultrasound on fermentation of skim milk medium for yield of yoghurt peptides by *Lactobacillus paracasei*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, p. 315–324, 1 mar. 2019.

KÖRZENDÖRFER, Adrian *et al.* Power ultrasound as a tool to improve the processability of protein-enriched fermented milk gels for Greek yogurt manufacture. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, p. 7826–7837, 2019.

LENTACKER, I.; DE COCK, I.; *et al.* Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 72, p. 49–64, 15 jun. 2014.

LIU, Wen Sin; YANG, Chun Yao; FANG, Tony J. Strategic ultrasound-induced stress response of lactic acid bacteria on enhancement of β -glucosidase activity for bioconversion of isoflavones in soymilk. **Journal of Microbiological Methods**, v. 148, p. 145–150, mar. 2018.

LIU, Ziyu *et al.* Screening of *Bifidobacteria* with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 13, n. 5–6, p. 215–219, 1 out. 2007.

MADA, Tanje *et al.* Effect of mixed banana and papaya peel pectin on chemical compositions and storage stability of Ethiopian traditional yoghurt (ergo). **International Dairy Journal**, p. 105, 19 abr. 2022.

MOHAMMADI, Reza *et al.* Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 411–424, set. 2011.

MUNFORD, Allan R.G. *et al.* Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. **Food Control**, v. 81, p. 2, 1 nov. 2017.

MUÑOZ, Raquel *et al.* Effects of ultrasound treatments on wine microorganisms. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, p. 10, 1 nov. 2021.

NG, Elizabeth W.; YEUNG, Marie; TONG, Phillip S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 5, 31 jan. 2011.

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of *Bifidobacteria* in milk fermentation. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 866–874, 15 fev. 2012.

CAPÍTULO II

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Stimulating fermentative activities of *Bifidobacteria* in milk by highintensity ultrasound. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 6, 1 jun. 2009.

NIAMAH, Alaa Kareem. Ultrasound treatment (low frequency) effects on probiotic bacteria growth in fermented milk. **Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2019.

NYANZI, Richard; JOOSTE, Piet J.; BUYS, Elna M. Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p. 14, 1 jan. 2021.

Official Methods of Analysis™, 21st Edition (2019) - **AOAC INTERNATIONAL**.

OJHA, K. Shikha *et al.* Ultrasound technology for food fermentation applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 414, 2017.

PARVANEH, Jafarei; MARYAM, Tajabadi Ebrahimi. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 24, p. 4033-4042, 2011.

PIMENTEL, Tatiana Colombo *et al.* Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 1 set. 2015.

POTOROKO, I. *et al.* Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 463–472, 1 nov. 2018.

RECCHIA, G. Bruna Rafaela. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada a base de soro lácteo ácido: caracterização físico-química e reológica**. 7 nov, 2014. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RIBEIRO, Maria Cecília E. *et al.* Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424–431, 1 dez. 2014.

SILVA P. Beatriz. **Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado**. 58 p. 12 jun. 2012. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2012.

SIQUEIRA, O. de M. Amanda; MACHADO, de C. L. Erilane *et al.* Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1693-1700, 2013.

SOUZA OLEGARIO, Lary *et al.* Impact of absence of lactose on the dynamic sensory profile of yogurt: A multiple-intake TDS approach. **LWT**, v. 162, p. 11, 1 jun. 2022.

CAPÍTULO II

SOUZA, Rodolfo Shon De. **Elaboração de bebida probiótica sabor manga e uva com *Lactobacillus acidophilus***. 28 jul. 2014. 17 p. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação (Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina-PR, 2014.

TERPOU, Antonia *et al.* Enhanced probiotic viability and aromatic profile of yogurts produced using wheat bran (*Triticum aestivum*) as cell immobilization carrier. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 1–10, 1 abr. 2017.

TONUCCI, B. Livia *et al.* Clinical application of probiotics in type 2 diabetes *mellitus*: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 85–92, 1 fev. 2017.

TSILIKA, Maria *et al.* A four-probiotic preparation for ventilator-associated pneumonia in multi-trauma patients: results of a randomized clinical trial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, p. 106471, 1 jan. 2022.

VIEIRA, C. Michele. **Produção de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionada de polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) utilizando cultura láctea tradicional do iogurte e linhagem probiótica**. 30 nov., 2017. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2017.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 8, p. 497–505, 1 ago. 1999.

VOGADO, Carolina de Oliveira *et al.* Enrichment of Probiotic Fermented Milk with Green Banana Pulp: Characterization Microbiological, Physicochemical and Sensory. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2018.

WANG, Cuina *et al.* Effects of polymerized whey protein on survivability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during freeze-drying. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 8, p. 2708, 2019.

WEAVER, James C. *et al.* Microdrop technology: A general method for separating cells by function and composition. **Methods**, v. 2, n. 3, p. 234–247, 1 jun. 1991.

YUE, Yingxue *et al.* Analysis of the complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with post-acidification capacity and its influence on yogurt in storage. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 2, p. 1058–1071, 1 fev. 2022.

3 CAPÍTULO III

EFEITO DA TECNOLOGIA DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM LEITES FERMENTADOS

RESUMO

A microbiologia preditiva possibilita o conhecimento dos parâmetros dos micro-organismos e assim pode-se compreender a dinâmica de crescimento de bactérias ácido lácticas em condições ambientais específicas. Neste sentido, pode auxiliar a explicar os efeitos de tecnologias emergentes no metabolismo celular, como a que tem sido aplicada em alimentos fermentados, por ser relacionada como causadora de modificações de taxa de crescimento e indução as vias metabólicas que levam à obtenção de diferentes rendimentos de produção: Ultrassom de Alta Intensidade (HIUS). Desta forma, um estudo metabólico envolvendo modelagem preditiva sobre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em co-cultivo com *L. acidophilus* LA 5 ou isoladamente em leites fermentados sob efeito da tecnologia de ultrassom seria uma oportunidade de trazer mais clareza para quais os melhores parâmetros de HIUS e condições do desenvolvimento de leites fermentados. No monitoramento do pH ao longo da fermentação das amostras do leite fermentado só com a cultura do iogurte (*Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) observou-se uma redução mais rápida nas amostras submetidas ao HIUS a Densidade Energética (DE) de 640 J.mL^{-1} , quando comparada ao tratamento controle (Sem HIUS) e aos demais tratamentos de HIUS, também houve um aumento da taxa de crescimento microbiano, de 2,14. O mesmo foi observado no tratamento com a DE de 200 J.mL^{-1} em leites fermentados só com a *L. acidophilus* LA 5, nestes casos pode-se constatar que uma fase LAG maior estava relacionada com um aumento da taxa de crescimento. Contudo, o leite fermentado contendo a cultura do iogurte e a cultura probiótica não apresentou influência com o efeito do ultrassom, e isso pode ser demonstrado com o fato das concentrações microbianas no início da fermentação serem menores do que as amostras controle, indicando que o HIUS inativou algumas células, que não conseguiram compensar e se sobressaírem no metabolismo. Portanto, se torna mais interessante aplicar o ultrassom separadamente nos leites fermentados só com culturas tradicionais do iogurte ou só com *Lactobacillus acidophilus* La 5 utilizando as DE de 640 e 200 J.mL^{-1} respectivamente.

Palavras-chaves: Microbiologia preditiva, fermentação, probióticos, parâmetros, tecnologias emergentes.

ABSTRACT

Predictive microbiology makes it possible to know the parameters of microorganisms and thus it is possible to understand the growth dynamics of lactic acid bacteria under specific environmental conditions. In this sense, it can help to explain the effects of emerging technologies on cellular metabolism, such as High Intensity Ultrasound (HIUS). Thus, a metabolic study involving predictive modeling on *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in co-culture with *L. acidophilus* LA 5 or alone in fermented milks under the effect of ultrasound technology would be an opportunity to bring more clarity to the best parameters of HIUS and conditions for the development of fermented milks. In monitoring the pH during the fermentation of the milk samples fermented with the yogurt culture alone (*Streptococcus* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) a faster reduction was observed in the samples submitted to the HIUS at Energy Density (DE) of 640 J.mL⁻¹, when compared to the control treatment (Without HIUS) and to the other HIUS treatments, there was also an increase in the microbial growth rate, of 2.14. The same was observed in the treatment with the DE of 200 J.mL⁻¹ in milks fermented only with *L. acidophilus* LA 5, in these cases it can be seen that a longer LAG phase was related to an increase in the growth rate. However, the fermented milk containing the yogurt culture and the probiotic culture did not influence the ultrasound effect, and this can be demonstrated by the fact that microbial concentrations at the beginning of fermentation were lower than in the control samples, indicating that HIUS inactivated some cells, which were unable to compensate and excel in metabolism. Therefore, it becomes more interesting to apply the ultrasound separately to fermented milks only with traditional yogurt cultures or only with *Lactobacillus Acidophilus* La 5 using DE of 640 and 200 J.mL⁻¹ respectively.

Keywords: Predictive microbiology, fermentation, probiotics, parameters, emerging technologies.

CAPÍTULO III

3.1 INTRODUÇÃO

A otimização do processo metabólico de micro-organismos é um assunto de interesse para a produção de alimentos fermentados. Em especial para preservar a viabilidade probiótica, visto que vários parâmetros endógenos, ou seja, associados à matriz alimentar, e exógenos, como exposição de células bacterianas a condições adversas de processamento, armazenamento e pós-ingestão de alimentos, podem afetar a viabilidade e o metabolismo microbiano (TSEVDOU *et al.*, 2020).

Desta forma, metodologias têm sido desenvolvidas com a finalidade de estimular o crescimento microbiano e manipulação de seu comportamento metabólico. Um exemplo é a aplicação de condições de estresse em níveis subletais antes ou durante a fermentação, a fim de afetar o crescimento e o metabolismo celular, modificar a taxa de crescimento e induzir as vias metabólicas que levam à obtenção de diferentes rendimentos de produção, como a tecnologia de Ultrassom de Alta Intensidade (HIUS) (DAHROUD *et al.*, 2016; HASHEMI *et al.*, 2018; MAENO *et al.*, 2019).

Há relatos de redução do tempo total de fermentação do leite, também de aumento das taxas de crescimento celular e consumo de açúcar, tal qual a mais rápida acidificação de micro-organismos como *Streptococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *L. acidophilus* (PENG, KAIDI *et al.*, 2020).

O número de células viáveis de bactérias ácido lácticas (BAL) durante a fermentação de um leite fermentado tratado com HIUS aumentou em 5%, com o tempo final de fermentação reduzido e consequente aumento da atividade da β -galactosidase (NIAMAH, 2019). Pode-se mencionar também o aumento das atividades enzimáticas extracelulares das proteases ácidas, neutras e alcalinas no leite desnatado fermentado com *Lactobacillus paracasei*, utilizando HIUS (HUANG *et al.*, 2019).

Fatores como as propriedades físicas, biológicas ou morfológicas dos micro-organismos, bem como os parâmetros de processo devem ser considerados para se aplicar o HIUS. Autores relataram que o HIUS levou a uma redução ou eliminação total da fase LAG da curva de crescimento de BAL nos leites, outros observaram um completo desaparecimento da fase LAG das bactérias lácticas durante a fermentação de leite bovino (ABESINGHE *et al.*, 2019).

A aplicação da microbiologia preditiva se torna uma forma de aprimorar o conhecimento dos parâmetros dos micro-organismos como as fases do processo fermentativo, e compreender

CAPÍTULO III

a dinâmica de crescimento de bactérias ácido lácticas. Isso decorre de maneira que a microbiologia preditiva utiliza modelos matemáticos para descrever respostas dos micro-organismos a condições ambientais específicas e verificam a sua utilização na previsão do crescimento, sobrevivência e inativação. De forma reprodutível, quando o levantamento de dados progressos pode prever as respostas em outros ambientes semelhantes (DOROTA *et al*, 2014; MCMEEKIN *et al*, 2008; ROSS e MCMEEKIN, 1994; VAN IMPE *et al*, 2005).

Apesar do profundo conhecimento sobre o metabolismo das BAL, um estudo metabólico envolvendo modelagem preditiva sobre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em co-cultivo com *L. acidophilus* sob efeito da tecnologia de ultrassom seria uma oportunidade de trazer mais clareza para quais os melhores parâmetros e condições do desenvolvimento de leites fermentados.

Desta forma, este estudo objetivou desenvolver 3 diferentes leites fermentados adicionados dos micro-organismos mencionados, avaliar o efeito de três densidades energéticas (200, 640 e 1600 J.mL⁻¹) na a mudança de pH e de concentração microbiana durante o processo fermentativo a 37°C, e finalmente se empregar a modelagem preditiva para avaliar o desempenho microbiano de cada formulação.

CAPÍTULO III

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental da proposta do estudo ocorreu nos seguintes locais: Setor de Higiene, Microbiologia e Toxicologia de Alimentos, nos Laboratórios de Microbiologia Industrial e Biocatálise e Microbiologia de Processos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). E também no laboratório de Resíduos Agroindustriais, no Departamento da Engenharia Mecânica da UFMG.

3.2.1 Material

Os ingredientes como leite integral pasteurizado, açúcar e leite em pó, necessários para o desenvolvimento dos leites fermentados, foram adquiridos no comércio local de Belo Horizonte – MG.

3.2.1.1 Culturas microbianas

A cultura utilizada para o preparo do iogurte foi uma cultura liofilizada, estocada a -18°C . Esta cultura é da marca Christian Hansen, adquirida na empresa Macalé Produtos de Laboratório LTDA, situada em Juiz de Fora. A cultura mista tradicional do iogurte utilizada foi a Yo-Flex[®] L 903, de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

A outra cultura utilizada foi uma cepa pura de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5[®]), que fazia parte do estoque microbiológico do laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise do Departamento de Alimentos (Faculdade de Farmácia, UFMG).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Padronização do inóculo da cultura de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, para a elaboração dos leites fermentados

A fim de ser ter uma concentração padronizada e mais alta de células, com no mínimo $9 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, três ativações consecutivas dos micro-organismos foram realizadas. Primeiramente transferindo-se 1 mL (da cultura congelada em tubos de 1,5 mL a -18°C) em 10 mL de MRS (Man, Rogosa & Sharpe, Acumedia, Lansing, MI, EUA) com 0,05% de cisteína-L Cloridrato H₂O P.A (Synth), cultivados em 24 horas à 37°C em condições de microaerofilia, elevando-se a escala em 20 e 300 mL de caldo MRS nas 48 e 72 horas posteriores (BERNUCCI *et al.*, 2017).

Após a incubação, a cultura foi centrifugada (centrífuga de laboratório refrigerada novatecnica NT825) por 15 minutos a $2.792 \times g$. Após o sobrenadante ter sido removido cuidadosamente, foram adicionados 5 mL de água destilada estéril ao concentrado de células,

CAPÍTULO III

centrifugado outra vez por 15 minutos, para novamente se remover o sobrenadante e se adicionar 10 mL de caldo MRS (BERNUCCI *et al*, 2017, adaptada).

Uma alíquota do volume ressuspensionado foi retirada para confirmar que o número de células viáveis foi maior que 9 Log UFC.mL⁻¹, por meio da metodologia de micro-gota (COELI, 2020; WEAVER *et al.*, 1991)

O número de células viáveis foi determinado conforme metodologia de diluição decimal seriada até 10⁻⁸ e consequente plaqueamento em meio MRS pela técnica de micro-gota, incubadas a 37 °C por 72 horas, com a adição de sobre-camada de ágar bacteriológico 2% para conferir uma condição de anaerobiose.

Finalmente, verificaram-se as contagens do número de unidades formadoras de colônias típicas de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 por mililitros UFC.mL⁻¹ (VIEIRA, 2017; WEAVER *et al*, 1991).

Enquanto o volume de células concentrado foi ressuspensionado e distribuído em *ependorfs* de 1,5 mL, da seguinte maneira: 1 mL de inóculo mais 25% de glicerol (70%), cada *ependorf* foi identificado e estocado a -80 °C. O residual deste concentrado de células padronizado foi deixado para se confirmar a morfologia das células por microscopia, por coloração de Gram (COELI, 2020; WEAVER *et al.*, 1991).

3.2.2.2 Ativação da cultura de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 para a elaboração dos leites fermentados

Para o desenvolvimento dos leites fermentados com adição da cepa probiótica, a cultura padronizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 foi descongelada e ativada para ser adicionada aos leites fermentados, passando um 1 mL para 10 mL de caldo MRS estéril, mantido por 24 horas a 37 °C. Esse volume, então, foi transferido para 100 mL de caldo MRS estéril novamente e incubado por mais 24 horas a 37 °C.

Após esse período, o caldo cultivado foi centrifugado por 10 minutos a 2.792 x g. O sobrenadante foi removido e ao material biológico centrifugado foram adicionados 5mL de água destilada estéril e realizada uma nova centrifugação por 10 minutos a 2.792 x g. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 5 mL de água peptonada (0,1 %), constituindo o inóculo (BERNUCCI *et al*, 2017, adaptada).

CAPÍTULO III

Desta forma, 4% da cultura ativada foi inoculada às formulações dos leites fermentados (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009). A concentração da cultura microbiológica adicionada ao leite para a fermentação foi determinada para se confirmar, no mínimo, 8 Log UFC.mL⁻¹ do inóculo preparado.

3.2.2.3 Preparo da cultura liofilizada Yo-Flex® L 903 (Christian Hansen), de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Inicialmente, preparou-se 100 mL de leite desnatado reconstituído a 10%, estéril (121 °C por 15 minutos), em que a cultura mista termofílica de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foi inoculada diretamente, diluindo-se, assepticamente, o conteúdo de 1 g nestes 100 mL de leite desnatado (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2012).

Finalmente, 2% desse inóculo foi adicionado às formulações dos leites fermentados. Previamente, se realizou a contagem de células viáveis a fim de confirmar, no mínimo, 8 Log UFC.mL⁻¹ (FATIMA D' ANGELIS, 2020).

3.2.2.4 Preparo das formulações de leites fermentados (pré-mistura)

Cada inóculo de micro-organismos ativados e adicionados p às formulações de leite fermentado, representados como Leite Fermentado (LF) I, II e III, na **Tabela 3.1**. A quantidade de leite integral pasteurizado necessária para o experimento foi definida conhecendo-se o volume de leite fermentado necessário para todas as amostras. Deste, foram acrescentados 8% de açúcar e 3% de leite em pó desnatado, conforme a metodologia descrita por (HASANI; KHODADADI; HESHMATI, 2016).

O leite em pó foi incluído à formulação para se elevar o teor de sólidos totais e produzir uma bebida mais consistente. Os ingredientes foram todos homogeneizados e o conteúdo foi distribuído em tubos Falcon, contendo 40 mL cada, que seguiram para a pasteurização a 95°C por 5 minutos, sendo imediatamente resfriados a 4°C para a adição dos inóculos e posterior uso de HIUS (HASANI *et al.*, 2017; HASANI; KHODADADI; HESHMATI, 2016).

TABELA 3.1- Leites fermentados distribuídos em 3 formulações, de acordo com as culturas adicionadas.

Leite Fermentado	2% v/v da cultura iniciadora	4% v/v da cultura iniciadora
I	<i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	*
II	<i>Streptococcus</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5
III	**	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5

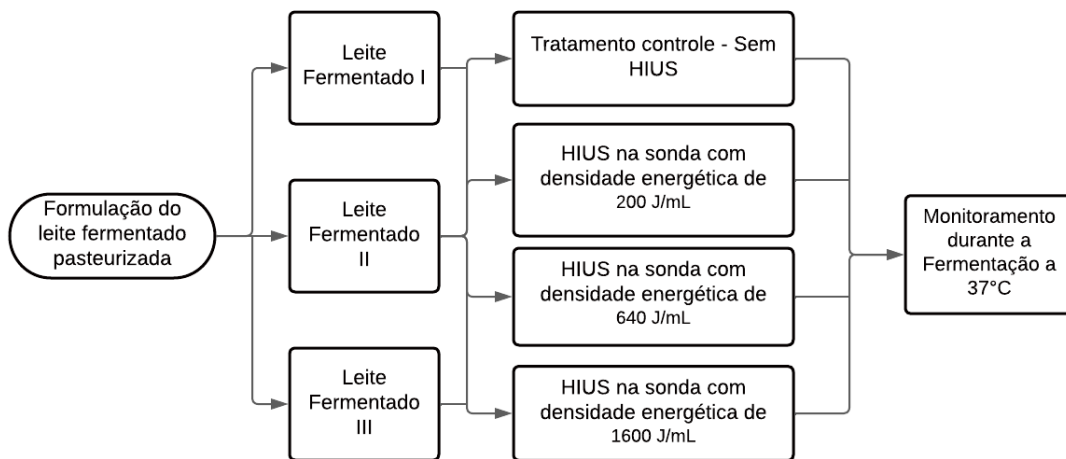
Notas: *No Leite Fermentado I não será adicionada cultura probiótica; **No Leite Fermentado III, não será adicionada cultura do iogurte.

Fonte: dados de pesquisa

3.2.2.5 Tratamento de HIUS

Os inóculos de cada formulação de leite fermentado foram adicionados às suas amostras de 40 mL de pré-mistura. A temperatura das amostras foi mantidas abaixo de 4 °C, as quais foram conduzidas à submissão dos tratamentos ilustrados na **Figura 3.1**.

FIGURA 3.1 Fluxograma dos leites fermentados que serão elaborados com e sem a tecnologia HIUS



Fonte: dados de pesquisa

Notas: a formulação do Leite Fermentado I foi adicionada só à cultura tradicional do iogurte. A formulação do LF II, à cultura do iogurte + a probiótica e a do III só à cultura probiótica.

CAPÍTULO III

Os tratamentos de HIUS (**Figura 2.4**) foram aplicados pelo equipamento de sonda ultrassônica, em que a amostra ficava posicionada submersa em um béquer contendo água a 25°C, a fim de se absorver o calor gerado com a sonicação (**FIG. 3.2**).

FIGURA 3.2- Amostras de formulações de leite fermentado sendo sonicadas por HIUS



Sonotrodo de ultrassom inserido na amostra sonicada submersa em um béquer com água a temperatura de 25°C.
Fonte: dados de pesquisa.

Baseando-se em dados encontrado em revisão da literatura científica sobre alimentos contendo BAL, que tiveram modulação microbiana com o HIUS, foi definido quais densidades energéticas (DE) de HIUS seriam usadas no experimento. Para se ajustar as condições dos equipamentos utilizados no experimento, a **Equação 1**, utilizada para se determinar a DE, permitiu encontrar a duração da sonicação das amostras, em detrimento de uma potência e volume específico. Os tubos continham 40 mL de mistura de ingredientes do leite fermentado pasteurizado, mas o volume do inóculo das culturas iniciadoras variou de formulação para formulação (GUIMARÃES; SILVA; *et al.*, 2018).

Equação 1:

$$DE (J/mL) = \frac{\text{Potência Nominal (W)} \times \text{Tempo de Processo (s)}}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

CAPÍTULO III

3.2.2.6 Tratamento de HIUS em sonotrodo

A aplicação de HIUS foi realizada assim como NIAMAH, 2019, de forma adaptada, utilizando sonda (equipamento da marca Ultronique, modelo QR 500, Brasil; 500 W, 20 kHz). O sonotrodo era constituído com uma macroponteira de espessura de 10 mm e comprimento de 64 mm. Em relação à superfície da amostra em tubos Falcon, a sonda foi colocada a aproximadamente 48 mm.

O parâmetro de densidade energética escolhida para cada tratamento foi aplicado ajustando-se a amplitude do aparelho com a duração de aplicação do HIUS, de acordo com o volume da amostra sonicada.

O Leite Fermentado I (só com a cultura iniciadora tradicional do iogurte) obteve um volume final da amostra de 40,8 mL. Assim, as condições foram ajustadas de acordo com a **Tabela 3.2**.

TABELA 3.2- Duração e Potência Nominal da aplicação de ultrassom com sonotrodo do Leite Fermentado I

Potência Nominal	Densidade energética	Duração
135 W	200 J.mL ⁻¹	1 minuto
360 W	1600 J.mL ⁻¹	3 minutos
435 W	640 J.mL ⁻¹	2 minutos

Fonte: dados da pesquisa

Já o Leite Fermentado II, com o volume final da amostra de 42,4 mL (ingredientes do leite fermentado + cultura mista do iogurte + cultura probiótica), teve as condições do equipamento de HIUS ajustados de acordo com a **Tabela 3.3**.

TABELA 3.3- Duração e Potência Nominal da aplicação de ultrassom com sonotrodo do Leite Fermentado II

Potência Nominal	Densidade energética	Duração
140 W	200 J.mL ⁻¹	1 minuto
375 W	1600 J.mL ⁻¹	3 minutos
450 W	640 J.mL ⁻¹	2 minutos

Fonte: dados da pesquisa

E finalmente, o Leite Fermentado III, só com a cultura iniciadora probiótica (com volume final da amostra de 41,6 mL), teve os parâmetros ajustados de acordo com a **Tabela 3.4**.

TABELA 3.4- Duração e Potência Nominal da aplicação de ultrassom com sonotrodo do Leite Fermentado III

Potência Nominal	Densidade energética	Duração
140 W	200 J.mL ⁻¹	1 minuto
370 W	1600 J.mL ⁻¹	3 minutos
445 W	640 J.mL ⁻¹	2 minutos

Fonte: dados da pesquisa

Mesmo a sonicação ocorrendo via sonotrodo, um béquer de água contendo água com temperatura controlada foi colocado em volta da amostra a aplicação das densidades energéticas de 1600, 640 e 200 J.mL⁻¹ promoveram os respectivos incrementos (Δ_T) de 35, 21 e 15 °C nas amostras sonicadas na sonda, com a temperatura da água no béquer em que a amostra estava submersa ajustada previamente a 25 °C.

3.2.2.7 Fermentação

Após a aplicação de todos os tratamentos, as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo (< 4 °C), exceto o tratamento controle (já mantido a essa temperatura), para que voltassem à temperatura de refrigeração. Assim, enquanto cada procedimento de HIUS era realizado, as amostras já sonicadas e resfriadas previamente em banho de gelo eram mantidas sob refrigeração a fim de que a fermentação se iniciasse concomitantemente aos demais tratamentos.

A etapa de sonicação foi realizada em menor tempo hábil possível. Após ela, a fermentação ocorreu por meio da incubação das amostras a 37 °C em estufa tipo B.O.D (WANG, XINYA; KRISTO; LAPOINTE, 2019).

3.2.2.8 Monitoramento de pH ao longo da fermentação

Nas formulações dos três leites fermentados, a etapa de fermentação foi monitorada com análise de pH desde o início da fermentação, no intervalo de 2 horas a cada aferição até 10 horas de fermentação, sendo que o próximo pH foi aferido no tempo de 20 horas.

3.2.2.9 Monitoramento da curva de crescimento microbiano das BAL de cada formulação de LF

As amostras de LF I foram coletadas para verificação da contagem microbiana: no primeiro momento da fermentação (tempo um, momento considerado como zero minutos), com uma hora de fermentação (tempo dois), uma hora e trinta (tempo três), duas horas (tempo quatro), três horas (tempo cinco), quatro horas (tempo seis), seis horas (tempo sete) e finalmente com oito horas (tempo oito).

CAPÍTULO III

O acompanhamento do crescimento microbiano com a contagem das amostras de LF II foi realizado: no primeiro momento da fermentação (tempo um, momento considerado como zero minutos), com trinta minutos de fermentação (tempo dois), uma hora (tempo três), uma hora e trinta (tempo quatro), duas horas (tempo cinco), quatro horas (tempo seis), seis horas (tempo sete) e finalmente com oito horas (tempo oito).

Finalmente se realizou acompanhamento do crescimento microbiano com a contagem das amostras de LF III: no primeiro momento da fermentação (tempo um, momento considerado como zero minutos), com duas horas de fermentação (tempo dois), quatro horas (tempo três), seis horas (tempo quatro), oito horas (tempo cinco), dez horas (tempo seis) e doze horas (tempo sete).

3.2.2.10 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. As amostras de leites fermentados, de todas as formulações e os seus respectivos tratamentos foram realizadas em três repetições.

3.2.2.11 pH

A aferição do pH nas amostras ocorreu conforme a metodologia AOAC, 2019 com a utilização do pHmetro MS Tecnoyon[®].

3.2.2.11 Avaliação da curva de crescimento das bactérias ácido lácticas

O plaqueamento em meio MRS não seletivo foi realizado com as amostras de Leites fermentados só com a cultura tradicional do iogurte, ou só com a cultura do *Lactobacillus acidophilus* LA-5, já nas formulações adicionadas de cultura tradicional de iogurte e probiótica foram realizados dois plaqueamentos, um em meio MRS, determinando o conteúdo de bactérias ácido lácticas totais, e outro em meio MRS seletivo só para *L. acidophilus* LA-5.

O ágar MRS-Bile (contendo 0,5 g.L⁻¹ de sais biliares e 1% de cisteína), para avaliar a sua seletividade na presença da cultura mista tradicional do iogurte (Yo-Flex[®] L 903). Foram executados ensaios descritos por VINDEROLA e REINHEIMER, 1999 obtendo recuperação de 98,74% para *L. acidophilus* La-5 e inibição total da cultura Yo-Flex[®] L 903 (SILVA, 2012).

Foi realizado diluições decimais seriadas até 10⁻⁷ para então realizar o plaqueamento dos leites fermentados em micro-escala, por meio da metodologia de micro-gota. Inicialmente, foi homogeneizado as amostras de LF para se coletar 100 µL, e transferidas para 900 µL de água peptonada com ágar (0,1% de peptona e 0,1% de ágar bacteriológico) estéril, e homogeneizou-

CAPÍTULO III

se o frasco da primeira diluição decimal vigorosamente em vortex (Biomixer). Dessa amostra, o procedimento foi replicado até uma concentração de 10^{-7} da alíquota inicial do LF inoculado (WEAVER *et al.*, 1991).

Desta forma, as diluições de 10^{-4} a 10^{-7} foram plaqueadas em micro-gotas de 10 μ L no meio de cultura específico de cada formulação, como anteriormente mencionado e incubadas a 37 °C por 72 horas, com a adição de sobre-camada de ágar bacteriológico 2%, conferindo uma condição de anaerobiose, para a quantificação do número de unidades formadoras de colônias típicas das bactérias ácido lácticas analisadas por mililitros (UFC.mL⁻¹) (VIEIRA, 2017; WEAVER *et al.*, 1991).

3.2.2.12 Microbiologia Preditiva

As contagens microbianas dos leites fermentados tratados no experimento foram expressas em unidades formadoras de colônia por mililitro, obtidas por meio de plaqueamento em micro-gota. Elas passaram pela conversão em base logarítmica e foram submetidas à modelagem matemática para se determinar os parâmetros de multiplicação microbiana: taxa de crescimento (s^{-1}) e tempo de adaptação (LAG em horas) das cepas. O cálculo se deu por um modelo primário, através da fórmula do modelo Baranyi expressa pela Equação 2 e 3 (BARANYI; ROBERTS, 1994; KIM *et al.*, 2022).

Equação 2:

$$y = y_0 + \mu A(t) - \ln \left(1 + \frac{\exp[\mu A(t)] - 1}{\exp(y_{max} - y_0)} \right)$$

Equação 3:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln (\exp (\mu t) + \exp (-\mu \lambda) - \exp (-\mu(t + \lambda)))$$

3.2.2.13 Análise estatística

As variáveis dependentes foram os dados como taxa de crescimento (s^{-1}) e tempo de adaptação (LAG) das cepas com e sem HIUS. A partir delas, verificaram-se as premissas de normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Os dados também serão submetidos à análise de variância com dois fatores (ANOVA *two-way*) e as médias comparadas, pelo teste de Tukey no nível de probabilidade 0,05, utilizando-se o programa R.

CAPÍTULO III

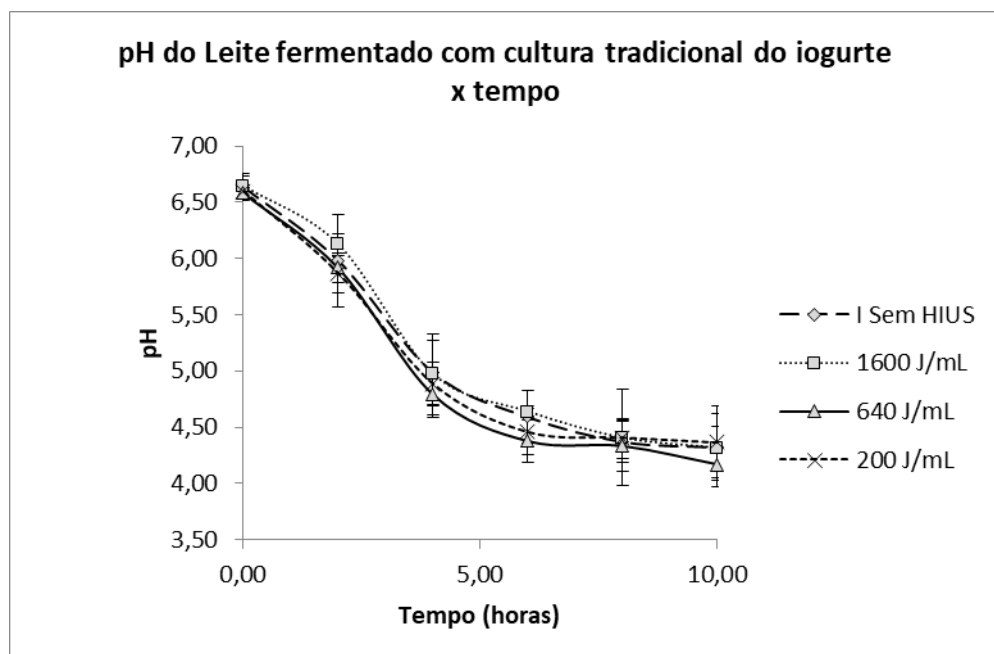
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 pH durante a fermentação

Os resultados do monitoramento do pH durante o processo fermentativo do leite fermentado só com a cultura do iogurte podem ser observados conforme dados apresentados na **Figura 3.4**.

As culturas presentes no LF I são *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, estas possuem uma complexa relação simbiótica (“protocooperação”) entre eles por meio de uma troca de metabólitos necessários para o crescimento de cada bactéria e resistência ao estresse ambiental durante a fermentação (WANG, TING *et al.*, 2016). Quanto mais rápido o pH se reduz, o tempo de fermentação se torna menor e a combinação do *S. thermophilus* e do *L. bulgaricus* é naturalmente atribuída às taxas de acidificação rápidas e como boas propriedades produtoras de ácido (LIU, WENJUN *et al.*, 2016).

FIGURA 3.4- Monitoramento do pH ao longo da fermentação do LF I



Fonte: dados de pesquisa.

O pH é monitorado em processos fermentativos para se acompanhar a evolução da fermentação, bem como no armazenamento do produto final (VIEIRA, 2017). Avaliando o comportamento do pH durante a fermentação do LF I pode-se observar que este foi diminuindo ao longo das horas. Este parâmetro variou de aproximadamente 6,67 até o pH final de 4,12 após 10 horas pelas amostras deste leite fermentado.

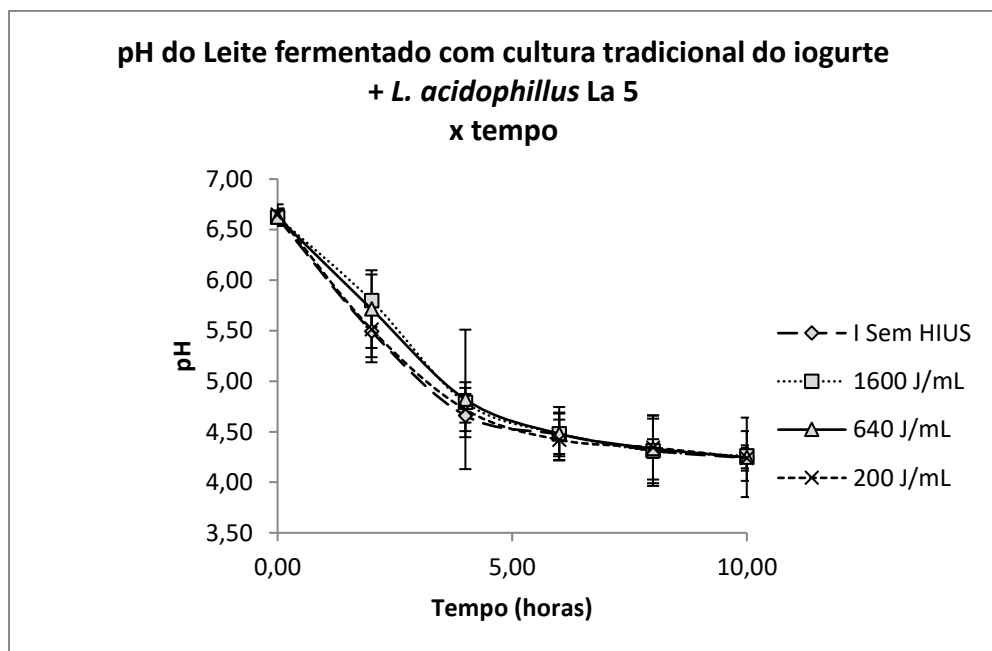
CAPÍTULO III

Pode-se observar na **3.3** que o pH das amostras do LF I apresentou uma redução mais rápida de pH nas amostras submetidas ao HIUS a DE de 640 J.mL^{-1} , quando comparada ao tratamento controle (Sem HIUS) e aos demais tratamentos de HIU. SFAKIANAKIS; TOPAKAS; TZIA, 2015 relataram que as amostras de leite sonicados com DE de 180 e 900 J.mL^{-1} levaram mais tempo para se iniciar a redução do pH contrapondo à redução mais rápida das DE de 314 e 450 J.mL^{-1} .

Os resultados do monitoramento do pH durante o processo fermentativo do leite fermentado em co-cultura do iogurte e do *Lactobacillus acidophilus* LA-5 são apresentados na **Figura 3.5**. O parâmetro variou de aproximadamente 6,61 até o pH final de 4,23 após 10 horas de fermentação pelas amostras deste leite fermentado. Pode-se observar que o pH das amostras que sofreram o tratamento de HIUS tiveram comportamento parecido, de redução mais lenta do pH, enquanto a amostra controle teve a redução do pH mais rápida.

O LF II apresentou tempo em torno de 5 a 4 horas e 30 minutos para que as amostras tivessem $\text{pH} < 4,60$, valores superiores ao trabalho de HASANI *et al*, 2016, que encontraram de 3,5 a 4 horas de fermentação em leites fermentados com a presença de cultura de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e *L. acidophilus*.

FIGURA 3.5- Monitoramento do pH ao longo da fermentação do LF II



Fonte: dados de pesquisa.

Neste caso, os autores aplicaram temperaturas de incubação de $42 \text{ }^\circ\text{C}$, diferente da temperatura aplicada no presente estudo, que foi de 37°C . O maior tempo pode ter decorrido

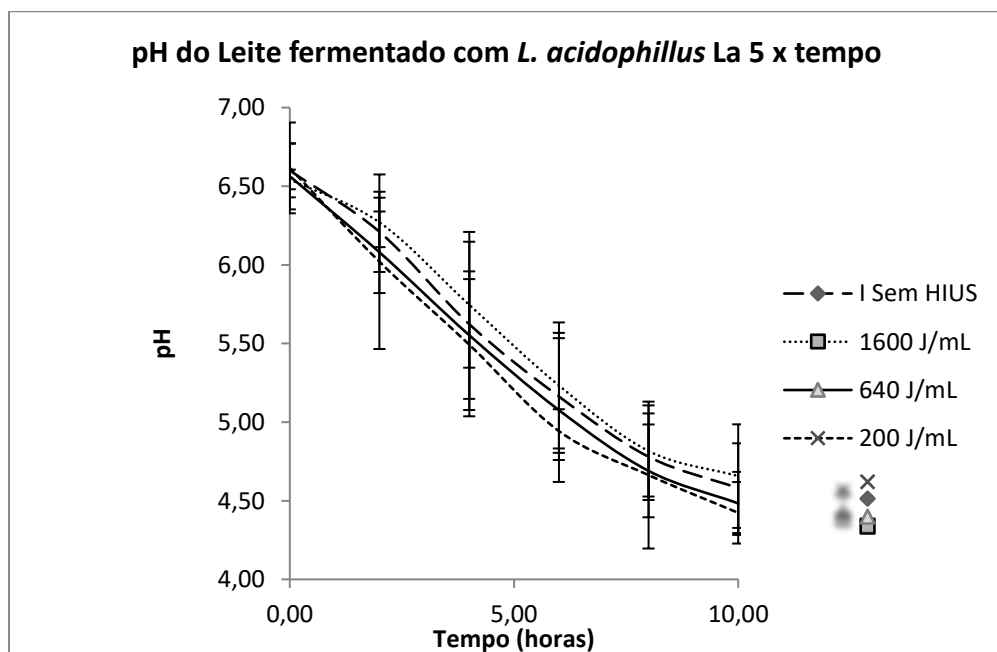
CAPÍTULO III

do fato destas diferentes temperaturas de fermentação, visto que, testes preliminares (dados não apresentados) com incubação a 42°C não terem refletido concentração de *L. acidophilus* La-5 maior que 7 Log UFC.mL⁻¹ (FATIMA D' ANGELIS, 2020).

É possível observar na **Figura 3.3** mudanças de pH durante o processo fermentativo do leite fermentado só com a cultura de *L. acidophilus* La-5, esta cepa possui pH ótimo de crescimento na faixa de 5,5 a 6,0 e temperatura ótima de 35 a 40 °C, e durante o processo fermentativo, as amostras do LF III foram mantidas a 37°C (RADDATZ, 2018).

O pH dos leites fermentados de todos tratamentos variaram de aproximadamente 6,69 até o pH final de 4,43 após 10 horas de fermentação. Pode-se observar que o pH das amostras que sofreram o tratamento de HIUS com DE de 1600 e 640 J.mL⁻¹ demoraram mais para reduzir o pH, enquanto a amostra controle teve a redução do pH mais rápida, todavia, dentre todas as amostras, aquelas submetidas a DE de 200 J.mL⁻¹ foram as que apresentaram a maior e mais rápida queda de pH em 10 horas de incubação do leite fermentado a 37°C.

FIGURA 3.6- Monitoramento do pH ao longo da fermentação do LF III



Fonte: dados de pesquisa.

As densidades energéticas de 1600 e 640 J.mL⁻¹ de HIUS podem ter inativado células de *L. acidophilus* La-5. Isto pode justificar que uma concentração menor de células pode ter produzido menos ácido e causado esta redução do pH mais lenta nas amostras, pois sofreram densidades energéticas mais altas, como observado por NGUYEN *et al*, 2012. Estes autores

CAPÍTULO III

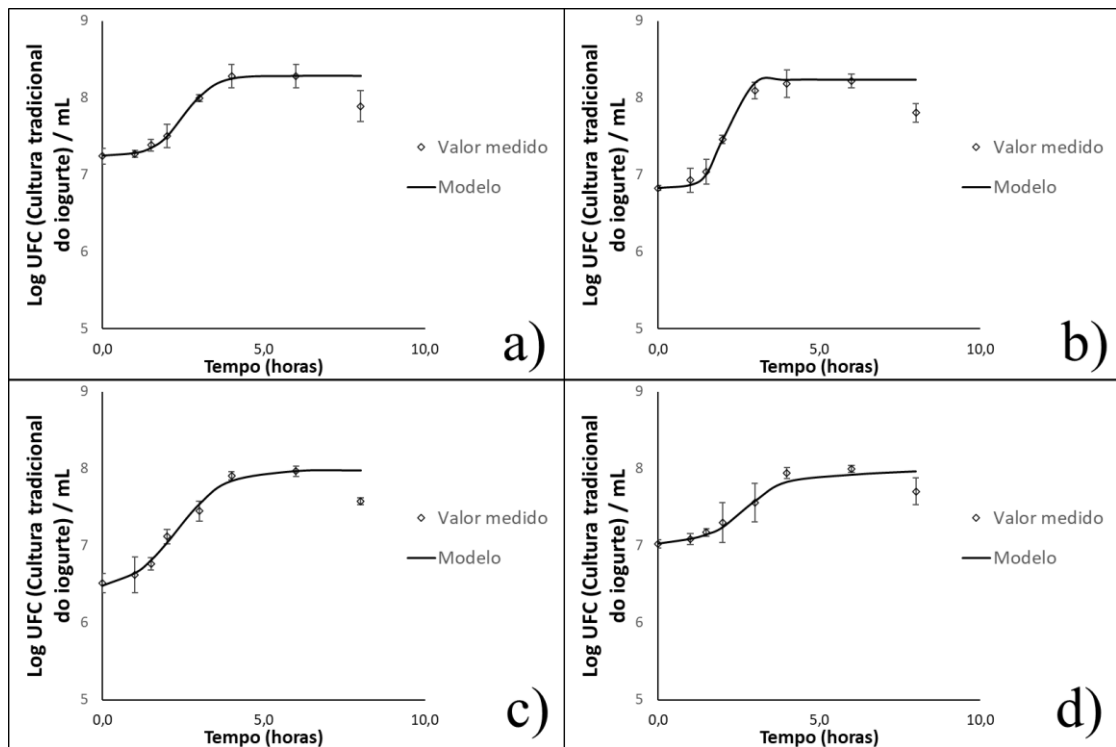
também observaram que densidades energéticas mais altas impactaram negativamente na viabilidade probiótica, enquanto de DE menores causaram o efeito de cavitação, devido esta densidade apresentar níveis subletais sobre as células.

3.3.2 Curva e parâmetros da microbiologia preditiva durante a fermentação

Na **Figura 3.7** se encontram os dados obtidos na determinação da concentração das bactérias presentes durante o processo fermentativo do leite adicionado somente da cultura tradicional do iogurte a 37°C. Foi possível observar que houveram concentrações iniciais distintas nos LF I submetidos a diferentes tratamentos.

O tratamento controle (Sem HIUS, letra d) obteve contagens médias iniciais de 7,0 Log UFC.mL⁻¹, enquanto com a DE a 200 J.mL⁻¹ de 7,2, a 640 J.mL⁻¹ de 6,83 e a 1600 J.mL⁻¹ de 6,51 Log UFC.mL⁻¹. E o leite fermentado que obteve contagens microbianas mais alto foi aquele tratado com 640 J.mL⁻¹, chegando a 8,30 após 6 horas de fermentação.

FIGURA 3.4- Modelagem preditiva de *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante período de incubação do LF I à 37°C



Modelo Baranyi aplicado para descrever o crescimento microbiano através dos pontos coletados

a) DE = 200 J.mL⁻¹; b) DE = 640 J.mL⁻¹; c) DE = 1600 J.mL⁻¹; d) DE = Sem HIUS.

Fonte: dados de pesquisa.

CAPÍTULO III

Os parâmetros cinéticos do leite fermentado (TAB. 3.5) podem ajudar a compreender como o HIUS influenciou o metabolismo celular.

TABELA 3.5- Parâmetros de crescimento da cultura tradicional do iogurte LF I contendo somente cultura tradicional do iogurte

Tratamento HIUS	LAG (horas)	Tratamento HIUS	Taxa de crescimento s ⁻¹
Sem tratamento	1.86 a	640 J.mL ⁻¹	2.14 a
640 J.mL ⁻¹	1.78 a	200 J.mL ⁻¹	1.37 ab
200 J.mL ⁻¹	1.70 a	Sem tratamento	1.00 b
1600 J.mL ⁻¹	1.30 a	1600 J.mL ⁻¹	0.74 b

(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

O processo fermentativo consiste em três fases a fase LAG, log e estacionária. A fase de latência ou LAG é caracterizada pela adaptação do micro-organismo ao novo meio e quando estes encontram as condições ideais para a sua multiplicação inicia-se a fase logarítmica (log), caracterizada pelo crescimento microbiano progressivo até que o número de células viáveis seja igual ao de células não viáveis (fase estacionária). Por fim, se inicia a fase de declínio, ou seja, quando há o fim do ciclo microbiano e diminuição do número de células (COELI, 2020; VÁZQUEZ-LIMA *et al.*, 2014; WEAVER *et al.*, 1991)

Apesar das diferentes concentrações iniciais de bactérias no LF I no início da fermentação, a fase de adaptação dos micro-organismos não se diferiram entre si ($p > 0,05$), todavia a taxa de crescimento (s⁻¹) das amostras foi maior para o tratamento com DE de 640 J.mL⁻¹, considerada estatisticamente superior a das amostras de leite fermentado Sem HIUS e com HIUS de 1600 J.mL⁻¹, o que infere que este tratamento aumentou a taxa de crescimento (s⁻¹) de *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Observou-se que a aplicação de HIUS (20 KHz, de 576 a 1440 J.mL⁻¹) após inoculação com culturas de iogurte seguida da fermentação reduziu a fermentação tempo por 30 min em iogurte (HONGYU; HULBERT; MOUNT, 2000). Da mesma forma, DOLATOWSKI *et al.*, 2007 relataram uma redução do tempo de produção de iogurte em até 40% com o uso de HIUS (ABESINGHE *et al.*, 2019)

Os relatos sobre o efeito de aceleração da etapa de fermentação ou de aumento da viabilidade microbiana oscilam dentre as diferentes condições de parâmetros de aplicação do HIUS, BARUKČIĆ *et al.*, 2015 avaliaram a ativação ultrassônica da cultura do iogurte YC-380

CAPÍTULO III

na fermentação de soro de leite, utilizando DE de 126 J/mL que resultou na redução do tempo de fermentação em comparação com a amostra controle.

Por outro lado, DELGADO *et al*, 2020 utilizaram densidades energéticas entre 241 e 723,6 J.mL⁻¹ no leite de cabra fermentado, porém a aplicação direta de todos os tratamentos HIUS reduziu a viabilidade das bactérias ácido lácticas.

Vale a pena ressaltar que o leite fermentado no presente estudo foi desenvolvido com leite integral, que possui estrutura físico-química e sensorial diferentes. Visto que, matrizes alimentares com uma maior diversidade de nutrientes, como o leite, possibilitam a aplicação de densidades energéticas consideradas mais altas, porque os micro-organismos possuem os constituintes da matriz para protegê-los da cavitação acústica (GUIMARÃES; BALTHAZAR; *et al.*, 2019).

Na **Figura 3.8** se encontram os dados obtidos na determinação da concentração das bactérias ácido lácticas totais presentes durante o processo fermentativo do leite adicionado da cultura tradicional do iogurte e cultura probiótica a 37°C. Na qual pode-se observar concentrações iniciais distintas nos LF II submetidos a diferentes tratamentos.

O tratamento controle (Sem HIUS, letra d) obteve contagens médias iniciais de 8,5 Log UFC.mL⁻¹, enquanto que aqueles tratados com a DE a 200 J.mL⁻¹ de 8,17, a 640 J.mL⁻¹ de 8,23 e a 1600 J.mL⁻¹ de 7,98 Log UFC.mL⁻¹. E o leite fermentado que obteve contagens microbianas mais altas foi o sem HIUS J.mL⁻¹ de 9,48 após 4 horas de fermentação.

Ou seja, as amostras tratadas com HIUS tiveram contagens iniciais menores, o que infere que o tratamento inativou algumas células, comparadas ao do controle, que por sua vez, apresentou uma contagem maior em seu pico de fermentação (de 4 horas) do que as dos demais tratamentos.

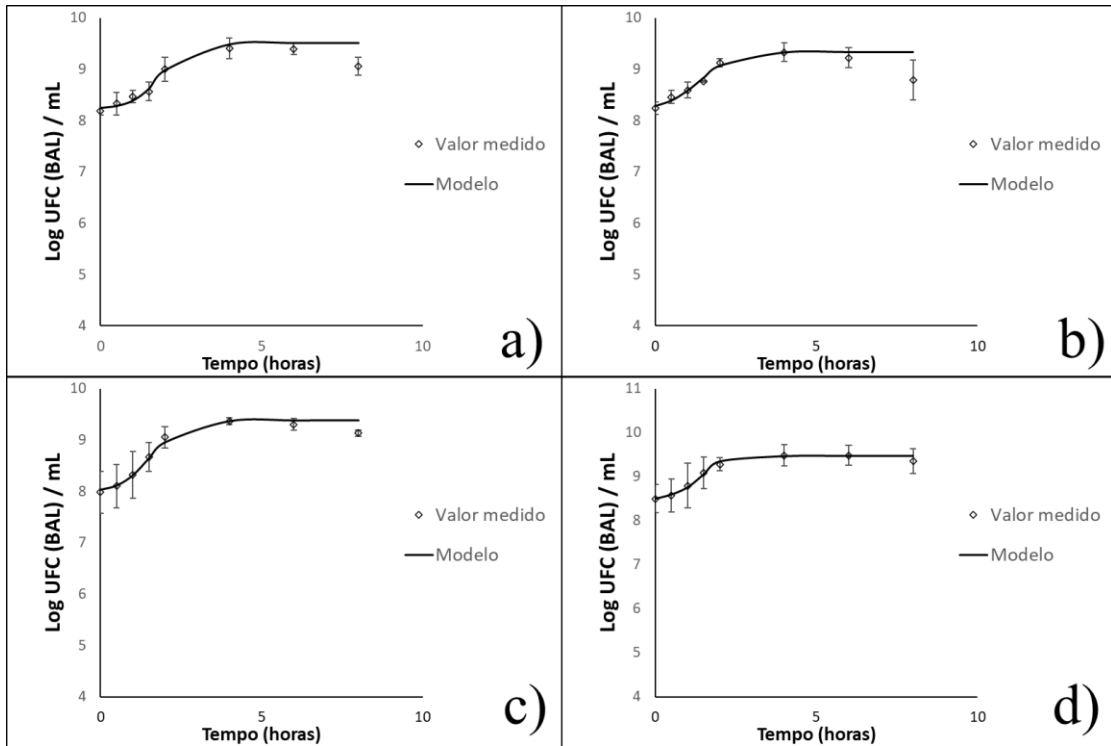
Desta forma, entende-se que o tratamento HIUS não apresentou efeito de otimização da fermentação de um leite fermentado em co-cultura do iogurte com *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Neste caso, o parâmetro deveria causar cavitação acústica e facilitar a troca de nutrientes nas células microbiana não se ajustou a algum dos micro-organismos.

Como o LF III era constituído por três cepas, duas do gênero *Lactobacillus* e uma do gênero *Streptococcus*, as diferentes morfologias podem ter resultado em um balanço negativo para a sensibilidade ao HIUS, visto que células maiores são mais suscetíveis ao efeito da

CAPÍTULO III

cavitação acústica, enquanto células menores são mais resistentes (CHÁVEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

FIGURA 3.8- Modelagem preditiva de *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *Lactobacillus acidophilus* LA-5 durante período de incubação do LF II à 37°C



Modelo Baranyi aplicado para descrever o crescimento microbiano através dos pontos coletados

a) $DE = 200 \text{ J.mL}^{-1}$; b) $DE = 640 \text{ J.mL}^{-1}$; c) $DE = 1600 \text{ J.mL}^{-1}$; d) $DE = \text{Sem HIUS}$.

Fonte: dados de pesquisa.

As fases de adaptação dos micro-organismos não se diferiram entre si ($p > 0,05$), bem como a taxa de crescimento (s^{-1}) não apresentou influência do HIUS na concentração de BAL no leite fermentado em co-cultura do iogurte e do *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (TAB. 3.6).

TABELA 3.6- Parâmetros de crescimento das BAL no LF II contendo cultura tradicional do iogurte + probiótica

Tratamento HIUS	LAG (horas)	Tratamento HIUS	Taxa de crescimento s^{-1}
200 J.mL^{-1}	1.27 a	Sem tratamento	1.60 a
1600 J.mL^{-1}	0.87 a	200 J.mL^{-1}	1.25 a
640 J.mL^{-1}	0.77 a	1600 J.mL^{-1}	1.13 a
Sem tratamento	0.77 a	640 J.mL^{-1}	0.93 a

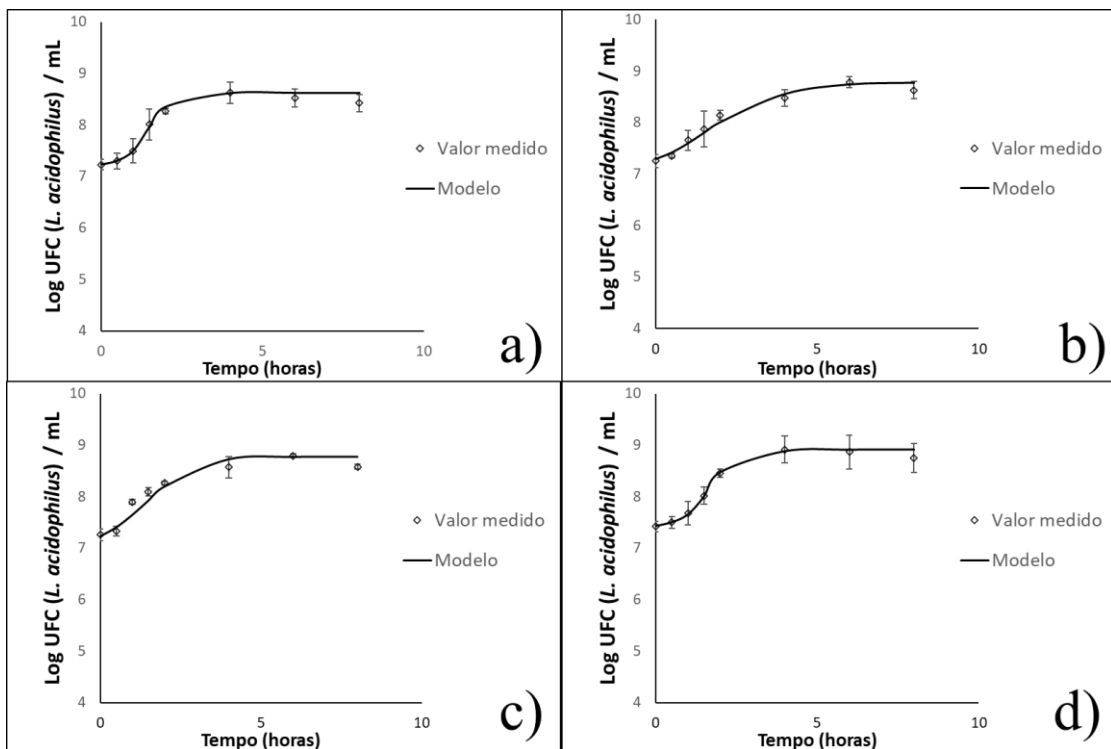
(a) Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

CAPÍTULO III

Na **Figura 3.9** se encontram os dados obtidos na determinação da concentração culturas microbianas presentes durante o processo fermentativo do leite adicionado da cultura tradicional do iogurte e a cultura probiótica a 37°C. Nota-se que as curvas de crescimento apresentaram contornos diferentes nos LF II submetidos a diferentes tratamentos.

O tratamento controle (Sem HIUS, letra d) obteve contagens médias iniciais de 7,41 Log UFC.mL⁻¹, enquanto com a DE a 200 J.mL⁻¹ de 7,22, a 640 J.mL⁻¹ de 7,10 e a 1600 J.mL⁻¹ de 7.03 Log UFC.mL⁻¹. E o leite fermentado que obteve contagens microbianas mais altas foi o de sem HIUS de 8,91 após 4 horas de fermentação.

FIGURA 3.9- Modelagem preditiva de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 durante período de incubação do LF II à 37°C



Modelo Baranyi aplicado para descrever o crescimento microbiano através dos pontos coletados

a) DE = 200 J.mL⁻¹; b) DE = 640 J.mL⁻¹; c) DE = 1600 J.mL⁻¹; d) DE = Sem HIUS.

Fonte: dados de pesquisa.

Estudos apontam que o ultrassom em níveis subletais promove a inativação de algumas células, e é necessário um tempo de fermentação inicial específico para que as células remanescentes compensem a redução inicial no tempo de fermentação, o que pode explicar,

CAPÍTULO III

que neste caso o ultrassom não contribuiu para otimização do processo fermentativo (GUIMARÃES; BALTHAZAR; *et al.*, 2019).

Por conseguinte, o LF II possui um tempo de fermentação muito rápido devido a alta carga microbiana e os parâmetros podem não ter sido modulados de forma correlacionada em cada cepa deste leite fermentado. Neste sentido, na **Tabela 3.7** têm-se os valores LAG e taxa de crescimento deste produto, que não se diferiram entre si ($p > 0,05$).

Apesar disso, pode-se observar que a fase de adaptação deste micro-organismo neste leite fermentado foi em torno de 1 hora, HASHEMI *et al.*, 2018 observara em um xarope de tâmara fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 apresentou uma leve redução de células viáveis no início do processo, entre 0 e 2 h, após esse período, as células foram capazes de recuperar a capacidade de crescimento. No presente estudo, a fase LAG dos LF II podem ter sido curtas demais para compensar as células remanescentes que tenham sido otimizadas pela cavitação acústica do HIUS.

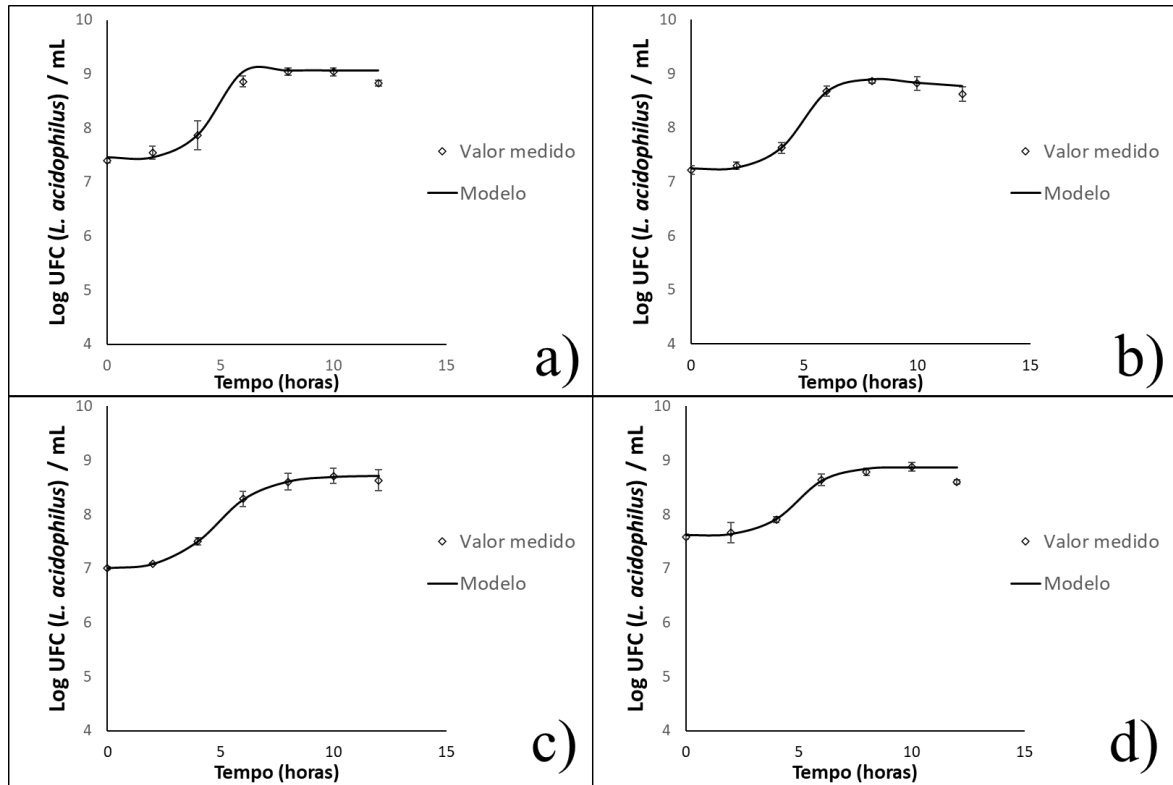
TABELA 3.7- Parâmetros de crescimento do *L. a.* LA 5 no LF II contendo cultura tradicional do iogurte + probiótica

Tratamento HIUS	LAG (horas)	Tratamento HIUS	Taxa de crescimento s^{-1}
Sem tratamento	1.01 a	200 J.mL ⁻¹	1.72 a
200 J.mL ⁻¹	0.98 a	Sem tratamento	1.54 a
640 J.mL ⁻¹	0.88 a	1600 J.mL ⁻¹	0.75 a
1600 J.mL ⁻¹	0.85 a	640 J.mL ⁻¹	0.65 a

(a) Médias seguida da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha < 0,5$).

Os resultados obtidos na determinação da concentração das bactérias presentes ao longo do tempo de incubação do leite fermentado só com a cultura probiótica a 37°C são demonstrados pela **Figura 3.10**. Os coeficientes de determinação R^2 que representam o erro médio calculado de todos os resultados de modelagem preditiva deste estudo variaram de 0,89 a 0,98, sendo que valores de R^2 próximos a 1 sugerem que o modelo se caracteriza como o que mais se adequa ao comportamento de multiplicação do microrganismo (PERINI, 2014).

FIGURA 3.10- Modelagem preditiva de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 durante período de incubação do LF III à 37°C



Modelo Baranyi aplicado para descrever o crescimento microbiano através dos pontos coletados

a) $DE = 200 \text{ J.mL}^{-1}$; b) $DE = 640 \text{ J.mL}^{-1}$; c) $DE = 1600 \text{ J.mL}^{-1}$; d) $DE = \text{Sem HIUS}$.

O tratamento controle (Sem HIUS, letra d) obteve contagens médias iniciais de 7,58 Log UFC.mL⁻¹, enquanto com a DE a 200 J.mL⁻¹ de 7,39, a 640 J.mL⁻¹ de 7,21 e a 1600 J.mL⁻¹ de 7,00 Log UFC.mL⁻¹. E o leite fermentado que obteve contagens microbianas mais altas foi o de sem HIUS de 9,04 após 8 horas de fermentação.

Apesar das diferentes concentrações iniciais de bactérias no LF III no início da fermentação, na **Tabela 3.8** observa-se que a fase de adaptação dos micro-organismos não se diferiram entre si ($p > 0,05$), sobretudo o LF submetido ao tratamento de 1600 J.mL⁻¹ apresentou o menor tempo de adaptação, quando sua taxa de crescimento foi a menor, esta sim com diferença, neste caso, entre a de 200 J.mL⁻¹, a mais rápida ($p > 0,05$).

Observações semelhantes foram relatadas por MUÑOZ *et al*, 2021 ao constatarem que o HIUS pode ter um efeito reversível na vitalidade probiótica, com o prolongamento da fase LAG (de adaptação), seguido por uma recuperação do crescimento.

TABELA 3.8- Parâmetros de crescimento do *L. A. LA 5* no LF III contendo somente a probiótica

Tratamento HIUS	LAG (horas)	Tratamento HIUS	Taxa de crescimento s ⁻¹
200 J.mL ⁻¹	4.01 a	200 J.mL ⁻¹	1.75 a
Sem tratamento	3.95 a	640 J.mL ⁻¹	0.80 b
640 J.mL ⁻¹	3.76 a	Sem tratamento	0.67 b
1600 J.mL ⁻¹	3.28 a	1600 J.mL ⁻¹	0.57 b

A taxa de crescimento das amostras foi maior para o tratamento com DE de 200 J.mL⁻¹, considerada estatisticamente superior a das amostras de leite fermentado Sem HIUS e com HIUS de 1600 e 640 J.mL⁻¹ o que infere que este tratamento como o mais adequado para se otimizar o processo fermentativo em leites fermentados só com *Lactobacillus acidophilus* LA-5 .

CAPÍTULO III

3.4 CONCLUSÃO

O estudo metabólico envolvendo modelagem preditiva dos diferentes leites fermentados desenvolvidos, trouxe informações de redução no tempo de fermentação para as amostras submetidas ao tratamento HIUS na sonda do LF I, com DE de 640 J.mL^{-1} e para o LF III a 200 J.mL^{-1} . Os parâmetros cinéticos destes produtos demonstraram que o aumento da taxa de crescimento microbiano estava relacionado com uma fase LAG também aumentada. Todavia, o leite fermentado com a co-cultura do iogurte e a cultura probiótica não sofreu influência com o HIUS aplicado pela sonda. Isto ocorreu possivelmente pelos parâmetros não terem sido adequados para se ter os efeitos aprimorados pelo HIUS ou por realmente quando se utiliza muitas cepas em um produto o ajuste de condições ótimas para cada um não ser atingido.

CAPÍTULO III

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aplicar o HIUS com DE de 0,08, 0,26 e 0,65 J.mL⁻¹, com as amostras submersas em um banho ultrassônico com temperaturas de 10 e 25°C não causa efeitos de otimização do metabolismo celular de BAL. Tentar utilizar densidades maiores, implicaria em aumentar o tempo de sonicação, no mínimo mais do que 10 minutos, o que acarretaria em uma etapa que prolongaria mais o processamento de leites fermentados.

Enquanto o HIUS aplicado com a sonda, apresentou o efeito de otimizar o metabolismo do leite fermentado só com a cultura do iogurte, com a densidade energética de 640 J.mL⁻¹ e do leite fermentado contendo só *Lactobacillus acidophilus* La 5, com DE de 200 J.mL⁻¹. Nestes casos, os efeitos foram observados tanto com as amostras submersas em banho a 10 e a 25°C.

Desta forma a temperatura de 25°C seria a mais indicada para estes tratamentos (DE de 640 J.mL⁻¹ no LF só com a cultura tradicional do iogurte e com DE de 200 J.mL⁻¹ no LF só com a cultura probiótica), por poupar mais recursos energéticos para se ter uma rede de frio nesta etapa.

Apesar destas amostras apresentaram redução do tempo de fermentação, elas não tiveram diferenças na viabilidade microbiana e parâmetros físico-químicos após o período de estocagem (28 dias) do tratamento controle.

O leite fermentado contendo a cultura do iogurte e a cultura probiótica submetidos ao HIUS na sonda demonstraram concentrações microbianas no início da fermentação menores do que as amostras controle, indicando que o HIUS inativou algumas células, que não conseguiram compensar e se sobressaírem no metabolismo.

Portanto, se torna mais interessante aplicar o ultrassom separadamente nos leites fermentados só com culturas tradicionais do iogurte ou só com *Lactobacillus acidophilus* La 5 utilizando as DE de 200 e 640 J.mL⁻¹ respectivamente a 25°C na sonda.

REFERÊNCIAS

- ABESINGHE, A. M.N.L. *et al.* Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 90, p. 1–14, 1 mar. 2019.
- BARANYI, József; ROBERTS, Terry A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3–4, p. 277–294, 1 nov. 1994.
- BARUKČIĆ, Irena *et al.* Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 94–101, 1 fev. 2015.
- CHÁVEZ-MARTÍNEZ, América *et al.* Low and High-Intensity Ultrasound in Dairy Products: Applications and Effects on Physicochemical and Microbiological Quality. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1688, 18 nov. 2020.
- COELI, C. R., Ana Luiza. **Bebida fermentada com potencial probiótico à base de extrato hidrossolúvel de soja com adição de grumixama (*Eugenia brasilienses*)**. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2020.
- D' ANGELIS, F., Danielle. **Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de leites fermentados com potencial probiótico adicionados de farinhas integrais de sorgo irradiadas**. 2020. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2020.
- DAHROUD, D. Behnaz *et al.* Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp.*casei* ATTC 39392. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 462–467, 1 maio 2016.
- DELGADO, Karina *et al.* Different ultrasound exposure times influence the physicochemical and microbial quality properties in probiotic goat milk yogurt. **Molecules**, v. 25, n. 20, 1 out. 2020.
- DOLATOWSKI, Zbigniew J.; STADNIK, Joanna; STASIAK, Dariusz. Applications of ultrasound in food technology. **Acta Sci.Pol. Technol. Aliment**, v. 6, n. 3 p. 88-99, 2007.
- DOROTA, Zielińska *et al.* Predictive modelling of *Lactobacillus casei* KN291 survival in fermented soy beverage. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 169–178, 1 fev. 2014.
- GUIMARÃES, Jonas T.; BALTHAZAR, Celso F.; *et al.* High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 57, n. March, p. 12–21, 2019.

CAPÍTULO III

GUIMARÃES, Jonas T.; SILVA, Eric Keven; *et al.* Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power levels. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 44, p. 251–260, 1 jun. 2018.

HASANI, Saber *et al.* Physicochemical and sensory attributes assessment of functional low-fat yogurt produced by incorporation of barley bran and *Lactobacillus acidophilus*. **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 4, p. 875–880, 1 jul. 2017.

HASANI, Saber; KHODADADI, Iraj; HESHMATI, Ali. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in rice bran-enriched stirred yoghurt and the physicochemical and sensory characteristics of product during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 2485–2492, 1 nov. 2016.

HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher *et al.* Effect of ultrasound on lactic acid production by *Lactobacillus* strains in date (*Phoenix dactylifera* var. *Kabkab*) syrup. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2635–2644, 1 mar. 2018.

HONGYU, Wu; HULBERT, Greg J.; MOUNT, John R. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 3, p. 211–218, 1 set. 2000.

HUANG, Guoping *et al.* Stimulation of low intensity ultrasound on fermentation of skim milk medium for yield of yoghurt peptides by *Lactobacillus paracasei*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, p. 315–324, 1 mar. 2019.

KIM, Ji Yoon *et al.* Development of predictive growth models of *Aeromonas hydrophila* on raw tuna *Thunnus orientalis* as a function of storage temperatures. **LWT**, v. 156, p. 113052, 15 fev. 2022.

LIU, WENJUN *et al.* Relationships between functional genes in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* isolates and phenotypic characteristics associated with fermentation time and flavor production in yogurt elucidated using multilocus sequence typing. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, p. 89–103, 1 jan. 2016.

MAENO, Shintaro *et al.* Introduction of bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Fructobacillus fructosus* settled its fructophilic characteristics. **Research in Microbiology**, v. 170, n. 1, p. 35, 1 jan. 2019.

MCMEEKIN, Tom *et al.* The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 2–9, 30 nov. 2008.

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of *Bifidobacteria* in milk fermentation. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 866–874, 15 fev. 2012.

CAPÍTULO III

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Stimulating fermentative activities of *Bifidobacteria* in milk by highintensity ultrasound. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 6, 1 jun. 2009.

NIAMAH, Alaa Kareem. Ultrasound treatment (low frequency) effects on probiotic bacteria growth in fermented milk. **Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2019.

Official Methods of AnalysisTM, 21st Edition (2019) - **AOAC INTERNATIONAL**.

PENG, Kaidi *et al.* Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 137, n. jul, p. 109544, 2020.

PERINI, Fabiana Oliveira. **Avaliação da multiplicação de *Bacillus thuringiensis* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva**. 2014. 23 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

RADDATZ, Greice Carine. **Estudo da adição de diferentes prebióticos em micropartículas simbióticas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtidas por gelificação iônica interna**. 23 fev,2018. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 3–4, p. 241–264, 1994.

SFAKIANAKIS, P.; TOPAKAS, E.; TZIA, C. Comparative Study on High-Intensity Ultrasound and Pressure Milk Homogenization: Effect on the Kinetics of Yogurt Fermentation Process. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 3, p. 548–557, 1 mar. 2015.

SILVA, Beatriz. **Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de *bifidobactérias* durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado**. 58 p. 12 jun. 2012. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2012.

TSEVDOU, Maria *et al.* Impact of High-Pressure Process on Probiotics: Viability Kinetics and Evaluation of the Quality Characteristics of Probiotic Yoghurt. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 8, 19 mar. 2020.

VAN IMPE, J. F. *et al.* Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 15 abr. 2005.

VÁZQUEZ-LIMA, Felicitas *et al.* Use of chemostat cultures mimicking different phases of wine fermentations as a tool for quantitative physiological analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 13 jun. 2014.

VIEIRA, C. Michele. **Produção de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de soja adicionada de polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)**

CAPÍTULO III

utilizando cultura láctea tradicional do iogurte e linhagem probiótica. 30 nov., 2017. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2017.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 8, p. 497–505, 1 ago. 1999.

WANG, Ting *et al.* Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 22–28, 1 out. 2016.

WANG, Xinya; KRISTO, Eleana; LAPOINTE, Gisèle. The effect of apple pomace on the texture, rheology and microstructure of set type yogurt. **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 83–91, 1 jun. 2019.

WEAVER, James C. *et al.* Microdrop technology: A general method for separating cells by function and composition. **Methods**, v. 2, n. 3, p. 234–247, 1 jun. 1991.