

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

DÉBORA PINHATARI FERREIRA

**VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LEITE
FERMENTADO POR *Lactobacillus helveticus* E *Enterococcus
faecium***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2021

DÉBORA PINHATARI FERREIRA

**VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LEITE
FERMENTADO POR *Lactobacillus helveticus* E *Enterococcus
faecium***

**Cell viability and antioxidant activity of fermented milk by *Lactobacillus
helveticus* and *Enterococcus faecium***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Marly Sayuri Katsuda

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA
2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

DÉBORA PINHATARI FERREIRA

**VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LEITE
FERMENTADO POR *Lactobacillus helveticus* E *Enterococcus faecium***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação para
obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 23 de agosto de 2021.

Luciana Furlaneto Maia -Coorientadora
Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Paraná
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Isabel Craveiro Moreira Andrei – Membro avaliador
Doutorado em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Margarida Masami Yamaguchi – Membro avaliador
Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

*“É preciso força pra sonhar e perceber que
a estrada vai além do que se vê”
(Marcelo Camelo)*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente as professoras Marly e Luciana por todo apoio, por me aceitarem como orientada e estarem sempre dispostas a me ensinar.

A minha família pelo carinho e incentivo para continuar. Ao meu namorado André pela força nos momentos de fraqueza.

As minhas colegas Ana Paula e Isabella por todo o trabalho que desenvolvemos juntas e pelos bons momentos.

As minhas amigas da graduação, Luana, Ludmilla, Vitória e Caroline pelas risadas e por esses quase quatro anos juntas.

As professoras Marianne e Lyssa pelo suporte durante as análises e a disposição.

Aos técnicos do LabMulti-Ld - Laboratório Multiusuário do Campus Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Talita e Rodolfo, pela disposição na realização das análises deste trabalho.

RESUMO

Existe um aumento pela demanda de alimentos com apelo a saudabilidade, que além da nutrição tragam benefícios aos seus consumidores, também denominados alimentos funcionais. Dentro desta classe se encaixam alimentos que possuam compostos bioativos, como antioxidantes, microrganismos probióticos e outros. Buscando diversificar seus produtos a indústria de laticínios pesquisa a utilização de diferentes espécies de bactérias probióticas podendo estas produzirem diferentes compostos com atividade antioxidante. O objetivo do presente trabalho está em formular um leite desnatado fermentado pelos microrganismos *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium* avaliando a composição proximal destes fermentados, a viabilidade dos microrganismos e a atividade antioxidante do produto acabado durante o período de armazenamento de 28 dias. Foram feitas três formulações: LH contendo *L. helveticus*; EF contendo *E. faecium*; e LHEF com a junção dos dois microrganismos. Os leites fermentados foram mantidos em temperatura de refrigeração (5°C) pelo período de 28 dias. Foram realizadas no primeiro dia as análises de composição proximal e nos dias 1, 7, 14 e 28 foram executadas a contagem de células em placa e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP. Os leites fermentados estão em conformidade com a legislação brasileira, sendo classificados como desnatados por possuírem teor de gordura inferior a 0,5%. Apresentam ainda contagem acima do exigido (mín. 10⁶ UFC/mL), obtendo-se valores de viabilidade superiores a 8 log UFC/mL em todos os tratamentos durante todo o experimento. Nas análises de antioxidante foi observada uma manutenção da atividade para as amostras LH e EF para as análises de DPPH e FRAP, não havendo diferença significativa durante o armazenamento. Já o tratamento LHEF apresentou queda dos valores de inibição entre os dias 14 e 28 para a análise de DPPH, alcançando valores de 12,05 a 17,36 % de inibição. O mesmo ocorreu na análise de FRAP, ocorrendo a queda na atividade Trolox equivalente indicando a diminuição da atividade antioxidante dos compostos bioativos presentes na amostra durante armazenamento. Deste modo o produto formulado atendeu aos requisitos da legislação em relação a sua composição e apresentou manutenção da viabilidade celular. Porém, a utilização das duas culturas em conjunto pode interferir na produção de compostos com atividade antioxidante durante o período de armazenamento.

Palavras-chave: leite fermentado. DPPH. FRAP. estocagem. composição proximal.

ABSTRACT

There is an increase in demand for food that appeal to healthiness, which in addition to nutrition brings benefits to their consumers, called functional foods. This class includes foods with bioactive compounds, such as antioxidants, probiotic microorganisms, and others. Seeking to diversify its products, the dairy industry researches the use of different species of probiotic bacteria, which can produce different compounds with antioxidant activity. The objective of this work is to formulate a skim milk fermented by the microorganisms *Lactobacillus helveticus* and *Enterococcus faecium* and to evaluate the proximate composition of the treatments, the viability of these microorganisms and the antioxidant activity of the product during the storage period (28 days). Three formulations were made: LH containing *L. helveticus*; EF containing *E. faecium*; and LHEF joining the two microorganisms. Fermented milks were kept at refrigeration temperature (5°C) for a period of 28 days. Proximate composition analyzes were performed on the first day and on days 1, 7, 14 and 28, plate cell count and antioxidant activity were performed by the DPPH and FRAP methods. Fermented milks are in accordance with the Brazilian legislation, being classified as skimmed because they have a fat content lower than 0.5%. They also have cell count above the required (min. 10⁶ UFC/mL), with viability values higher than 8 log UFC/mL in all treatments throughout the experiment. In the antioxidant analysis, activity stability was observed for the LH and EF samples for the DPPH and FRAP analyses, with no significant difference during storage. The LHEF samples showed a decrease in the percentage of inhibition between days 14 and 28 for DPPH analysis, reaching values from 12.05 to 17.36 % of inhibition. The same occurred in the FRAP analysis, with the decrease in the Trolox equivalent activity, indicating a decrease in the antioxidant activity of the bioactive compounds present in the sample during storage. In this way, the formulated product fulfills the requirements of the legislation in relation to its composition and showed maintenance of cell viability. However, the use of the two cultures together can interfere in the production of compounds with antioxidant activity during the storage period.

Keywords: fermented milk. DPPH. FRAP. storage. proximate composition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Requisitos físico-químicos e microbiológicos de caracterização de leite fermentado durante seu período de validade, segundo IN 46/07	14
Tabela 2 – Tratamentos de leite fermentado, microrganismos adicionados e sua concentração	21
Tabela 3 – Composição proximal com desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)	24
Tabela 4 – Contagem de microrganismos viáveis em log UFC/mL com desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)	25
Tabela 5 – Análise DPPH expresso em % de inibição e desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)	26
Tabela 6 – Análise DPPH expresso em % de inibição e desvio padrão comparando as médias dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)	28
Tabela 7 – Análise FRAP expresso em capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) e desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)	29
Tabela 8 – Análise FRAP expresso em capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) e desvio padrão comparando as médias dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 LEITE FERMENTADO.....	13
3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	14
3.2.1 <i>Lactobacillus helveticus</i>	16
3.2.2 <i>Enterococcus faecium</i>	17
3.3 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS..	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 ATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS	20
4.2 DESENVOLVIMENTO DO LEITE FERMENTADO	20
4.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	21
4.4 VIABILIDADE CELULAR	21
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
4.5.1 DPPH	22
4.5.2 FRAP	22
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO PROXIMAL	24
5.2 VIABILIDADE CELULAR	24
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	26
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Recentemente houve o surgimento de diversas pesquisas na área de alimentos funcionais, suplementos e outros que melhoram a saúde de seu consumidor (AKIN; OZCAN, 2017). Exemplos de alimentos funcionais incluem aqueles que contém minerais específicos, diferentes vitaminas, ácidos graxos, fibras dietéticas, adição de substâncias biologicamente ativas, como fitoquímicos, antioxidantes e probióticos (GUL; SINGH; JABEEN, 2016). Os derivados lácteos são os produtos mais testados para a incorporação de ingredientes que possuam finalidades funcionais (MARTINS; OLIVEIRA; FERREIRA, 2018).

O leite é um alimento rico em nutrientes que favorecem o crescimento de bactérias que compõem a microbiota láctica natural. Dentre as bactérias prevalentes destacam o grupo das bactérias do ácido láctico (BAL) e incluem os gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* e *Wiessella* (FOX *et al.*, 2017).

As BAL são microrganismos gram-positivos conversores de glicose em ácido láctico (homofermentativas) ou com subprodutos secundários ao metabolismo, como etanol, ácido acético, dióxido de carbono (heterofermentativas) (FERREIRA, 2006).

De acordo com Instrução Normativa n. 46 (BRASIL, 2007) esses microrganismos devem estar presentes em contagens acima de 10^6 UFC/mL. Difere do iogurte pois sua fermentação ocorre por diferentes cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium sp*, *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas.

Leite fermentado é um produto definido pela International Dairy Federation como produto produzido a partir de leite integral ou desnatado, com culturas de microrganismos específicos. São produtos que possuem componentes biologicamente ativos com importante participação na dieta nutricional (AKIN; OZCAN, 2017). São produtos obtidos através da adição de culturas lácteas em leite previamente tratado termicamente, que em seguida é submetido a temperatura de incubação para atingir o pH e acidez esperados, e são escolhidos por laticínios como veículo de culturas denominadas probióticas (SAVAIANO; HUTKINS, 2021; SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

Diferentes culturas vêm sendo pesquisadas para formulação de diferentes produtos com compostos bioativos, como peptídeos com atividade antioxidante.

Deste modo o presente trabalho teve como objetivo a formulação de um leite desnatado fermentado por *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium* avaliando a viabilidade dos microrganismos e a atividade antioxidante dos fermentados e o impacto do tempo de armazenamento.

2 OBJETIVO

Avaliar a viabilidade celular e atividade antioxidante de leite fermentado por culturas lácticas de *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium*, durante período de armazenamento de 28 dias.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular um leite fermentado por culturas lácticas de *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium*;
- Determinar a composição proximal do produto formulado;
- Avaliar a viabilidade dos microrganismos por contagem em placas durante no período de 28 dias de armazenamento;
- Determinar a atividade antioxidante do fermentado no período de armazenamento.

3 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LEITE FERMENTADO

Os leites fermentados estão entre os principais alimentos funcionais produzidos por laticínios, sendo utilizados como veículos de bactérias probióticas que devem estar presentes e viáveis em níveis adequados durante todo o período de armazenamento do produto. Diferentes bactérias vêm sendo estudadas para introdução nos derivados lácteos, avaliando sua viabilidade, características tecnológicas e possíveis benefícios que e podem acrescentar ao produto acabado, como formação de compostos bioativos com atividade antioxidante.

3.1 LEITE FERMENTADO

Muitos dos produtos disponíveis no mercado são derivados do resultado da fermentação espontânea do leite por bactérias ácido lácticas ocorrido a séculos atrás, por meio das condições climáticas e tradições locais de manejo do leite. Os leites fermentados originalmente foram desenvolvidos como meio de preservação dos nutrientes (BUTTRISS, 1997). O processo fermentativo para preservação do leite é datado há aproximadamente 10.000 anos no Oriente Médio (FOX, 2015).

Os produtos lácteos representam um dos maiores segmentos de alimentos funcionais no mercado, onde são utilizados como veículos promissores de ingredientes funcionais, como bactérias probióticas, compostos prebióticos, proteínas, vitaminas e minerais (AKIN; OZCAN, 2017).

Estes produtos fazem sucesso mundialmente e entre os fatores responsáveis estão a relação com alimentos funcionais, visando benefícios a saúde, tecnologia de fabricação simples, preço acessível e aumento relativo no prazo de validade em comparação ao leite fluido (CARNEIRO *et al.*, 2012). Dentro da classe de alimentos funcionais os derivados lácteos vêm ganhando destaque nas pesquisas e visto como importante fonte nutricional por parte de profissionais na saúde, principalmente por seu conteúdo proteico e lipídico (DONNELLY, 2006).

Segundo a Instrução Normativa n. 46 (BRASIL, 2007) entendem-se por leites fermentados os produtos adicionados ou não de substâncias alimentícias, obtidas por meio da diminuição do pH e coagulação do leite ou de leite reconstituído, que pode ser adicionado ou não de outros produtos lácteos, mediante fermentação

lática por cultivos de microrganismos específicos. Nos leites denominados fermentados ou cultivados os microrganismos fermentadores incluem *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp*, *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas (BAL) que contribuem para a determinação das características no produto acabado. Ainda, segundo a IN 46/07 o produto final deve conter requisitos mínimos para ser considerado um leite fermentado, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Requisitos físico-químicos e microbiológicos de caracterização de leite fermentado durante seu período de validade, segundo IN 46/07

Requisitos	Limite permitido
Acidez (g de ácido láctico/100g de produto)	0,6 a 2,0
Proteínas lácteas (g/100g)	Min. 2,9
Contagem de bactérias lácticas (UFC/mL)	Min. 10 ⁶

Fonte: Adaptado de Brasil (2007).

Os leites fermentados ou cultivados são produzidos pela adição de bactérias adequadas a um leite animal previamente tratado termicamente, seguido da incubação para redução do pH, com ou sem tratamento pré-coagulação (SAVAIANO; HUTKINS, 2020). Durante a fermentação há transformação da lactose em ácido láctico e o aumento da acidez, fenômeno que desfavorece o crescimento de outros microrganismos que não sejam bactérias ácido lácticas (SHIBY; MISHRA, 2013).

De acordo com Vlieg e Hugenholtz (2007) a fermentação, além de auxiliar na preservação do alimento, tem importante influência na qualidade sensorial do produto, pois durante o processo ocorre a modificação química de componentes da matéria prima e produção de metabólitos, que contribuem para o “flavour”. A lactose, o citrato, proteínas e gorduras do leite são convertidos em compostos voláteis e não voláteis que são responsáveis pelo sabor e odor agradável de produtos fermentados.

3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza, predominantemente na microbiota de substratos ricos em carboidrato, peptídeos e aminoácidos, vitaminas e com baixa tensão de oxigênio (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000). Pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* e *Wiessella* (FOX *et al.*, 2017). A classificação em diferentes gêneros das BAL é baseada no modo de fermentação da glicose, seu crescimento nas diferentes temperaturas, a produção de ácido láctico, habilidade de crescimento em meios contendo alta concentração de sal, tolerância a ácidos e álcalis (MOTTA; GOMES, 2015)

São bactérias Gram positivas, não esporuladas, na forma de cocos, bacilos ou cocobacilos e utilizam lactose como fonte de carbono, resultando na produção de altas concentrações de ácido láctico (GATTI *et al.*, 2014). A maioria são catalase negativa, com exceção de algumas espécies que em baixa concentração de açúcar podem produzir pseudo-catalase. Convertem glicose em ácido láctico (homofermentativas) ou em outros produtos, incluindo CO₂, etanol e/ou ácido acético (heterofermentativas) (FERREIRA, 2006). As BAL heterofermentativas são comumente encontradas no leite e outros derivados, porém seu crescimento e produção excessiva de CO₂ e ácido pode causar defeitos nos produtos (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018).

Esse grupo de bactérias obtém ATP somente através da fermentação, geralmente utilizando açúcares. Como não utilizam oxigênio no metabolismo energético possuem crescimento em ambiente aeróbico e anaeróbico (KHALID, 2011). Estão geralmente associadas a ambientes ricos em nutrientes, como alimentos diversos (leite, carne, vegetais) mas também participam da microbiota bucal, intestinal e vaginal de mamíferos (WHITTENBURY, 1964).

Devido à acidificação e produção de enzimas essas bactérias são utilizadas como culturas starter e são adicionadas no processo de coagulação das proteínas do leite. A indústria utiliza fermentos selecionados que contem BAL, principalmente *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii*, que proporcionam aspectos previsíveis e desejáveis (FERNANDES, 2009).

Outra característica de algumas BAL é a produção de bacteriocinas. Estas são definidas como peptídeos antimicrobianos sintetizadas no ribossomo das bactérias. Tem o poder de inibir ou eliminar o crescimento de células próximas (INGOLF; DRAG; DZUNG, 2013). Além de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes, estas bacteriocinas também podem inibir algumas espécies de BAL (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018).

Podem ser caracterizados como microrganismos probióticos, porém devem atender a requisitos como resistência às condições do trato gastrointestinal, ter capacidade de colonizar e aderir às células intestinais, produzir substâncias com ação antimicrobiana e estarem metabolicamente ativos no intestino (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

3.2.1 *Lactobacillus helveticus*

A espécie *Lactobacillus helveticus* tem ganhado importância como cultura promotora de saúde em alimentos probióticos e fármacos. Tem potencial de produção de peptídeos bioativos e bacteriocinas, e exerce efeito simbiótico quando associado a prebióticos em alimentos fermentados (GIRAFFA, 2014).

O microrganismo é enquadrado no grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e algumas cepas possuem designação GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) pela *Food and Drug* dos Estados Unidos e apresentam uma série de características que o tornam adequado para aplicação em alimentos. Tradicionalmente é utilizado para produção de queijos suíços e queijos italianos de longa maturação, como Grana Padano, Parmegiano Regiano e outros (GIRAFFA, 2014). Possui metabolismo homofermentativo e termofílico (VINDEROLA *et al.*, 2007) e possui a habilidade de redução do amargor e adição de características sensoriais favoráveis para queijos, o que faz da bactéria um importante componente como cultura *starter* para laticínios (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013).

Apresentam bom crescimento em temperaturas variando de 40-45°C e em temperaturas máximas de 50-52°C. Entretanto não se desenvolvem abaixo de 15°C. Podem ser obtidos de leites fermentados, soro fermento, fermentos lácticos e queijos como *Emmental*, *Gruyère*, Parmesão e Provolone (MELO *et al.*, 2011).

L. helveticus necessita de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres para seu crescimento, contudo são substratos que não estão presentes

naturalmente no leite. Como modo de desenvolvimento possui um sistema ativo de proteases a fim de hidrolisar as proteínas presentes no leite e obter os peptídeos necessários (BEGANOVIC *et al.*, 2013). Cremonesi *et al.* (2013) adiciona o potencial do *L. helveticus* de produzir peptídeos com função biológica de inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE), demonstrando o valor terapêutico na espécie quando usada em produtos lácteos fermentados.

É utilizado como cultura adjunta na produção de queijos semiduros com baixo teor de gordura, pois promove o aumento da proteólise, diminui o sabor amargo e intensifica sabores sensorialmente desejáveis (DRAKE; SWANSON, 2005).

De acordo com Slaterry *et al.* (2010) a espécie de lactobacilo é utilizada na produção de bebidas fermentadas como Evolus (Finlândia) e Calpis (Japão), cujas propriedades são associadas com a redução de pressão sanguínea após sua ingestão. São reportados vários peptídeos isolados de produtos fermentados com *L. helveticus*, que possuem funções fisiológicas, como peptídeos imunoestimuladores, antimicrobianos, com ação opioide, anti-hipertensivos (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013).

3.2.2 *Enterococcus faecium*

O gênero *Enterococcus spp.* faz parte do grupo de microrganismos categorizados como bactérias ácido lácticas. As espécies de enterococos anteriormente foram agrupadas com espécies de estreptococos e categorizadas juntamente no gênero *Streptococcus spp.* (LA DEVRIFE *et al.*, 1995). Em 1984 através de estudos de hibridização e sequenciamento do RNA ribossômico indicou que as espécies de *S. fecalis* e *S. faecium* eram diferentes das demais espécies de estreptococos (FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006) e então Scheleifer e Kilpper-Bälz (1984) propuseram a transferência para o gênero *Enterococcus spp.*

Os enterococos tem temperatura ótima de crescimento na faixa de 35°C, porém a maioria das espécies do gênero conseguem crescer em temperaturas no intervalo de 10 a 45°C. Também apresentam crescimento na presença de 6,5% de NaCl e pH 9,6 e sobrevivência em tratamento térmico de 60°C por 30 minutos (FOLQUIÉ MORENO, 2006).

As espécies de estreptococos crescem frequentemente em leite cru e derivados lácteos. Possuem muitas propriedades tecnológicas, que incluem a

produção de bacteriocinas, potencial probiótico e utilização para tecnologia de lácteos (YERLIKAYA; ABKULT, 2019). Por sua atividade lipolítica e proteolítica, principalmente a espécie *E. faecium* apresenta papel no desenvolvimento de características sensoriais em produtos fermentados, como queijos, salsichas, carnes maturadas e azeitonas (FRANZ *et al.*, 2011).

E. faecium tem sido estudado em relação a seu potencial probiótico. Em estudos prévios Furlaneto-Maia *et al.* (2017) demonstram que a espécie apresenta habilidade de sobrevivência na presença de sais biliares, lisozima e enzimas pancreáticas, baixo pH e alta capacidade de agregação, atendendo a critérios de microrganismos probióticos. Por outro lado, Gilmore, Lebreton e Van Schaik (2013) apontam *E. fecalis* e *E. faecium* como os principais agentes causadores de infecções em humanos, onde na década de 1970 emergiram como principais causadores de infecções nosocomiais.

3.3 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES POR BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS

Durante o processo metabólico diversas reações ocorrem utilizando espécies de oxigênio reativo como peróxido de hidrogênio, radical superóxido aniônico e outros. Os sistemas biológicos possuem mecanismos antioxidantes de origem enzimática e não enzimática para controlar os danos causados pelo excesso dos radicais livres, que podem desencadear diferentes patologias, desde doenças cardiovasculares a promoção de câncer. Os antioxidantes endógenos são enzimas, como a catalase e superoxi desmutase, e outras não enzimas, como a bilirrubina e a albumina que agem na presença desses radicais. Entretanto, quando o organismo é exposto ao excesso dessas espécies reativas o sistema de compostos endógenos pode falhar em garantir essa proteção. Para compensar o déficit o corpo pode usar antioxidantes exógenos consumidos dos alimentos, suplementos e fármacos (SANTOS-SANCHÉZ *et al.*, 2019).

De acordo com Angelo e Jorge (2007) os antioxidantes podem atuar nos organismos na proteção de células contra radicais livres, impedindo que os mesmos sejam formados e reparando os danos já causados. Podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos bloqueiam a iniciação da oxidação onde as enzimas são responsáveis pela remoção das espécies reativas

ao oxigênio. Os não enzimáticos interagem com os radicais consumindo-os durante a reação.

Compostos antioxidantes são aqueles capazes de exercer a função *in vivo* ou nos alimentos por inibir a geração dos radicais livres ou por sua eliminação direta. Quando presentes em menor concentração em relação ao composto oxidável, os antioxidantes inibem a oxidação do substrato ou reduzem significativamente o processo. Nos alimentos sua atuação ocorre com a finalidade de manutenção da qualidade dos alimentos e evitar processos degradativos, como a rancificação (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Nos alimentos fermentados, durante o processo de fermentação as bactérias formam, além de ácidos orgânicos, diversos compostos bioativos com atividade antioxidante (ALMEIDA, 2011). As propriedades antioxidantes demonstradas em leite fermentado de bovinos e de camelo sugerem que, além do seu valor nutricional, eles também são potenciais candidatos para alimentos funcionais e formulação de novos alimentos, que melhoram a saúde através do seu consumo (KORHONEN, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é composto por uma pesquisa quantitativa, avaliando a viabilidade celular e atividade antioxidante de leite fermentado pelos microrganismos *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus*. O experimento teve início no dia 01/02/2021 com término das análises no dia 15/07/2021.

4.1 ATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Para o experimento foram utilizadas duas culturas de microrganismos: cultura liofilizada de *Lactobacillus helveticus* (LH 091) da empresa Sacco-Italy e cultura de *Enterococcus faecium* cedida pela Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto-Maia.

A cultura de *L. helveticus* foi pesada de forma asséptica e adicionada caldo BHI (Brain Heart Infusion, HiMedia, Mumbai-Índia) na concentração de 1 % (m/v), seguido de incubação por 48 horas a 42 °C.

A cepa de *E. faecium* utilizada se encontrava isolada em tubo eppendorf, pertencendo a bacterioteca do Laboratório de microbiologia básica e aplicada (Lamba), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, sob coordenação da Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia. O conteúdo do tubo eppendorf foi inoculado em caldo BHI e incubado a 36°C por 48 horas.

A partir dos caldos, ambos os microrganismos foram estriados em ágar leite modificado (BROWN; SCOTT-FOSTER, 1970) e incubados a 42 °C por 24 horas. De cada microrganismo foram retiradas colônias adicionadas em água estéril seguindo a escala de turbidez de McFarland para concentração $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Alcançada a concentração desejada a solução foi utilizada como inóculo inicial para adição em leite fermentado.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO LEITE FERMENTADO

Para desenvolvimento do fermentado foi utilizado leite Molico® (Araçatuba-Sp) desnatado reconstituído com concentração de 14% de sólidos totais (m/v) e adicionado de 7% (m/v) de sacarose. Os ingredientes foram misturados e homogeneizados, em seguida aquecidos a 90°C por 5 minutos e após tratamento térmico resfriado a aproximadamente 42°C.

Foi então adicionada a cultura previamente ativada de *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium*, divididos em 3 tratamentos:

Tabela 2 – Tratamentos de leite fermentado, microrganismos adicionados e sua concentração

TRATAMENTO	MICROORGANISMO	CONCENTRAÇÃO (UFC/mL)
LH	<i>L. helveticus</i>	10 ⁷
LHEF	<i>L. helveticus</i>	5x10 ⁶
	<i>E. faecium</i>	5x10 ⁶
EF	<i>E. faecium</i>	10 ⁷

Fonte: Autoria própria.

Os tratamentos foram realizados em três repetições. Após adição dos microrganismos os leites foram incubados a ± 42 °C e retirados quando a acidez alcançou valores próximos a 0,6 g de ácido láctico por 100 g de fermentado. Em seguida foram separados de forma asséptica em frascos com aproximadamente 120mL, vedados com plástico filme e acondicionados em câmara fria a temperatura de refrigeração. Ali foram mantidos por 28 dias para realização das nos dias 1, 7, 14 e 28 de armazenamento.

4.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

As análises de composição foram realizadas em triplicata de acordo com a AOAC. A determinação de lipídeos foi realizada por método de Gerber de acordo com Kirk e Saywer (1991) para leites fermentados. A proteína foi quantificada de forma indireta pelo método de Micro-Kjeldahl, descrito por Bradstreet (1957). Umidade e sólidos totais foram obtidos através de secagem em estufa a 105°C, até peso constante, e as cinzas por incineração em mufla a 550 °C, com carbonização prévia.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

De cada tratamento de leite fermentado foi retirada uma alíquota e feitas diluições seriadas consecutivas até a concentração de 10⁻⁸. A partir dessas diluições foram inoculados 1 mL em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe, HiMedia, Mumbai-

Índia) por profundidade, para contagem de *L. helveticus* do tratamento LH e contagem total do tratamento LHEF. Utilizando as mesmas diluições foram inoculados 100µL por superfície em ágar KEA (Kanamicina, Esculina, Azide, Merk KGaA, Darmstadt-Alemanha) para selecionar e quantificar colônias de *E. faecium* nos tratamentos LHEF e EF. As placas de MRS foram incubadas a 42°C por 48 horas e as placas de KEA a 36 °C por 48 horas.

A contagem de *L. helveticus* no tratamento LHEF foi feita através de exclusão, utilizando a contagem total de colônias em ágar MRS subtraindo o número de colônia obtidas em ágar KEA (específico para enterobactérias), quantificando assim os microrganismos de forma separada.

Após o período de incubação, as colônias de cada tratamento foram contadas e realizadas os cálculos para determinação da UFC/mL.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar a atividade antioxidante das amostras de leite fermentado foram realizadas as análises de DPPH e FRAP, descritas a seguir.

4.5.1 DPPH

Para análise da ação sobre os radicais livres foi utilizado o método colorimétrico de DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) descrito primeiramente por Brand-Willians et al. (1995), Arnao (2000) com modificações por Rufino et al. (2007). Para tanto, foram pipetados 200 µL das amostras e 3 mL de solução de DPPH (0,06 mM) adicionados em tubos e homogeneizados em agitador. As leituras foram efetuadas após 30 minutos de reação. Foi utilizado o espectrofotômetro UV-visível Biochrom-Libra com leitura no comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição (%) utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(abs. amostra - abs. branco) \times 100] / abs. controle negativo$$

4.5.2 FRAP

O método FRAP se baseia na capacidade do antioxidante em reduzir Fe^{+3} em Fe^{+2} . Para realização da análise foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) com modificações. Foram utilizados 100 μL da amostra, com 370 μL de água deionizada e adicionados 3 mL da solução de FRAP (complexo férrico), que foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A absorvância foi medida em 595 nm. A curva padrão foi feita utilizando solução de Trolox.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas três repetições de cada tratamento, e as análises realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram analisados no programa RStudio (1.3.1093), com análise de variância ANOVA e teste de Tukey de comparação de médias ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor apresentação dos resultados, separou-se nos tópicos análise de composição proximal, viabilidade celular e atividade antioxidante, descritos a seguir.

5.1 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos nas análises de composição proximal dos diferentes tratamentos de leite fermentado.

De acordo com a Instrução Normativa n. 46 (BRASIL, 2007) que regulamenta padrões de identidade e qualidade de leites fermentados, é exigido como requisito físico-químico o teor mínimo de 2,9 % de proteínas lácteas. Todos os tratamentos apresentam média superior a este requisito e, tendo em vista que a matéria prima utilizada foi leite em pó desnatado, as formulações apresentaram conformidade com a legislação vigente. Ainda de acordo com a mesma legislação, os leites fermentados se classificam como desnatados, devido às concentrações de lipídeos serem inferiores a 0,5 %.

Tabela 3 – Composição proximal com desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)

COMPONENTES	TRATAMENTOS		
	LH	LHEF	EF
Extrato Seco Total (%)	17,34 ± 0,12 ^a	17,27 ± 0,25 ^a	17,29 ± 0,14 ^a
Umidade (%)	82,66 ± 0,12 ^a	82,73 ± 0,25 ^a	82,71 ± 0,14 ^a
Proteína (%)	3,47 ± 0,33 ^b	4,25 ± 0,72 ^a	3,33 ± 0,46 ^a
Lipídeos (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Cinzas (%)	0,97 ± 0,12 ^a	0,97 ± 0,07 ^a	0,98 ± 0,07 ^a
Carboidratos (%)	13,24 ± 1,16 ^a	12,05 ± 0,52 ^b	13,39 ± 1,15 ^a

Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

LH: leite fermentado por *L. helveticus*; EF: leite fermentado por *Enterococcus faecium*; LHEF: leite fermentado por *L. helveticus* e *E. faecium*.

Fonte: Autoria própria.

5.2 VIABILIDADE CELULAR

As contagens de microrganismos viáveis nos diferentes tratamentos cumpriram as exigências da Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007) por apresentarem contagem superior a mínima requerida de 10^6 UFC/mL, como mostra a Tabela 4. No tratamento com *L. helveticus* a contagem a partir do 7 dia apresentou diferença estatística da contagem inicial (dia 1) e se manteve estável durante o período restante de armazenamento.

Tabela 4 – Contagem de microrganismos viáveis em \log_{10} UFC/mL com desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)

Tratamento	Microrganismo	Repetição	Tempo de armazenamento (dias)			
			1	7	14	28
LH	<i>L. helveticus</i>	1	8,57 ^{Bb} ±0,05	9,15 ^{Ba} ±0,04	9,01 ^{Ca} ±0,03	9,15 ^{Ba} ±0,10
		2	8,90 ^{Ab} ±0,04	9,37 ^{Aa} ±0,05	9,12 ^{Aa} ±0,04	9,50 ^{Aa} ±0,05
		3	8,81 ^{Ac} ±0,06	9,21 ^{Aa} ±0,00	9,03 ^{BCab} ±0,02	9,01 ^{Bb} ±0,01
LHEF	<i>L. helveticus</i>	1	8,72 ^{Aa} ±0,05	8,74 ^{Aa} ±0,02	8,64 ^{Aa} ±0,06	8,77 ^{Aa} ±0,04
		2	8,65 ^{Aa} ±0,12	8,99 ^{Aa} ±0,02	8,59 ^{Aa} ±0,51	8,82 ^{Aa} ±0,08
		3	8,64 ^{Aa} ±0,20	8,95 ^{Aa} ±0,02	8,71 ^{Aa} ±0,19	8,88 ^{Aa} ±0,04
LHEF	<i>E. faecium</i>	1	8,26 ^{Abc} ±0,06	7,80 ^{Ac} ±0,29	8,62 ^{Aab} ±0,15	8,71 ^{Aa} ±0,25
		2	7,95 ^{Abc} ±0,25	7,87 ^{Ac} ±0,02	8,15 ^{Aab} ±0,04	8,67 ^{Aa} ±0,18
		3	8,05 ^{Ac} ±0,14	8,08 ^{Ac} ±0,04	8,62 ^{Ab} ±0,15	8,88 ^{Aa} ±0,01
EF	<i>E. faecium</i>	1	8,81 ^{Ab} ±0,04	8,16 ^{Ac} ±0,08	9,25 ^{Aa} ±0,05	8,88 ^{Bb} ±0,10
		2	8,96 ^{Aa} ±0,03	8,28 ^{Ab} ±0,20	9,95 ^{Aa} ±0,05	9,20 ^{Aa} ±0,03
		3	8,78 ^{Ab} ±0,02	8,27 ^{Ac} ±0,06	9,07 ^{Aab} ±0,07	9,29 ^{Aa} ±0,09

Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Fonte: Autoria própria.

O valor encontrado foi inferior ao reportado por Hati, Sakure e Mandal (2017) que obtiveram contagem de *L. helveticus* de aproximadamente 10,40 log UFC/mL no tratamento controle de leite fermentado desnatado. O tempo de fermentação e a concentração de sólidos solúveis neste estudo foi de 12 horas e 10%, respectivamente, sendo inferior ao tratamento LH, onde o leite foi fermentado por aproximadamente 16 horas com concentração de sólidos de 14%. Entretanto, foi adicionada a concentração de 1%(v/v) de cultura fermentada em meio MRS, não havendo a contagem inicial do inóculo para avaliar a concentração de

microrganismos adicionada, possível causa para a diferença de valores de contagem.

No tratamento LHEF a contagem de *L. helveticus* se manteve estável durante todo o período de armazenamento em todas as repetições. Já na contagem de *E. faecium* houve um aumento significativo crescente no decorrer do período de armazenamento, com valores inferiores no dia 1 (7,95-8,26 log UFC/mL), alcançando valores de 8,67 a 8,88 log UFC/mL no 28º dia de armazenagem. A fermentação dos açúcares e a acidificação do leite por bactérias ácido lácticas conferem maior viabilidade a estas bactérias (NASCIMENTO, 2017). Também são fatores importantes no processo de conservação e segurança dos produtos lácteos, por controlar o crescimento de microrganismos contaminantes (FIGUEIREDO, 2014).

No tratamento EF foram observadas diferenças significativas durante o armazenamento, onde valores de contagem superiores ($p < 0,05$) foram obtidos no 14º e 28º dia, repetindo o comportamento de *E. faecium* no tratamento LHEF, com exceção da repetição 1, onde ocorreu uma queda na contagem entre os dias 14 e 28.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) é um radical livre que aceita um elétron ou radical hidrogênio, tornando-se uma molécula estável. É utilizada como substrato para avaliação de atividade antioxidante de peptídeos ou hidrolisados proteicos (CÔRREA *et al.*, 2011). Os resultados da análise de DPPH estão presentes na Tabela 5.

Os compostos antioxidantes mantiveram sua atividade durante o período de armazenamento no tratamento LH. El-Sayed, Awad e Abou-Soliman (2021) avaliaram a porcentagem de inibição de DPPH em leite de camelo fermentado por *L. helveticus*. Estes obtiveram valores entre 30 e 40 % nos dias 1 e 7 de armazenamento, valores próximos aos obtidos no 1º dia analisado. Em estudo desenvolvido por Virtanen *et al.* (2006) a atividade antioxidante por 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) de leite pasteurizado desnatado fermentado por *L. helveticus* foram obtidos valores variando de 12% a 28% de inibição dependendo da cepa analisada.

Tabela 5 – Análise DPPH expresso em % de inibição e desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)

Tratamento	Repetição	Tempo de armazenamento (dias)			
		1	7	14	28
LH	1	36,95±3,19 ^{Aa}	22,22±3,45 ^{Aa}	24,39±3,27 ^{Aa}	28,07±8,81 ^{Aa}
	2	29,06±4,30 ^{Aa}	24,39±5,87 ^{Aa}	21,24±2,45 ^{Aa}	14,66±6,86 ^{Aa}
	3	33,20±3,92 ^{Aa}	30,37±3,81 ^{Aa}	20,45±4,27 ^{Aa}	16,04±14,26 ^{Aa}
LHEF	1	8,19±0,31 ^{Ab}	15,84±0,83 ^{Ab}	25,90±2,06 ^{Aa}	12,05±1,08 ^{Ab}
	2	12,56±3,50 ^{Ab}	17,16±0,65 ^{Ab}	28,01±3,29 ^{Aa}	17,36±2,63 ^{Ab}
	3	14,07±5,43 ^{Aa}	22,81±5,71 ^{Aa}	20,84±5,17 ^{Aa}	14,59±0,93 ^{Aa}
EF	1	22,68±6,83 ^{Aa}	36,88±3,55 ^{Aa}	25,64±3,68 ^{Ab}	6,97±1,61 ^{Bb}
	2	29,72±4,68 ^{Aa}	39,71±2,06 ^{Aa}	29,85±4,65 ^{Aa}	24,79±2,22 ^{Aa}
	3	22,48±2,70 ^{Aa}	31,43±4,67 ^{Aa}	30,51±4,61 ^{Aa}	24,72±1,65 ^{Aa}

Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)
 Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)
 LH: leite fermentado por *L. helveticus*; EF: leite fermentado por *Enterococcus faecium*; LHEF: leite fermentado por *L. helveticus* e *E. faecium*.

Fonte: Autoria própria.

O tratamento LHEF apresentou diferenças entre os dias 7 e 14, apresentando um aumento significativo no 14º dia em comparação aos demais tempos e uma queda ao final do período (dia 28). É esperado que ocorra um aumento no percentual de inibição pois, de acordo com Lima *et al.* (2014) há um aumento na atividade antioxidante durante estocagem devido à liberação de enzimas pelos microrganismos na matriz do alimento durante o armazenamento. Entretanto apenas no 14º dia do tratamento LHEF ocorreu esse aumento, seguido de queda no 28º dia onde as médias se igualaram aos demais tempos.

No fermentado EF foi observada uma estabilidade dos valores de inibição de DPPH nas repetições 2 e 3, diferindo da repetição 1 onde houve a diminuição a partir do 7º dia. Valores próximos a 20 % de inibição foram obtidos por Nascimento (2017) em estudo com leite reconstituído com 12 % de sólidos fermentado por *E. faecium*. Esses valores foram alcançados apenas após 28 dias de armazenamento, diferindo dos resultados obtidos neste trabalho onde porcentagens superiores a 20 % foram alcançadas a partir do primeiro dia. Estudos com *Enterococcus spp.*, que inclui a espécie *E. faecium*, revelam potencial de aplicação desses microrganismos devido às suas atividades proteolíticas, lipolíticas e autolíticas, e com a produção de

exopolissacarídeos (EPS). Essas enzimas proteolíticas e lipolíticas podem gerar peptídeos e radicais peróxido que possuem atividade antioxidante (ASPRI *et al.*, 2017)

Comparando os três tratamentos que constam na Tabela 6 não foram observadas diferenças estatísticas entre a atividade antioxidante dos tratamentos LH e EF. Nos primeiros dois tempos (dia 1 e 7) o tratamento LHEF apresentou valores inferiores, indicando que a associação de ambas as bactérias diminuía a atividade no leite fermentado. Todavia, a partir do 14º dia os valores para LHEF se igualaram estatisticamente aos tratamentos com apenas um microrganismo, podendo a diferença inicial decorrer de problemas com a análise.

Tabela 6 – Análise DPPH expresso em % de inibição e desvio padrão comparando as médias dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)			
	1	7	14	28
LH	33,07±8,48 ^A	25,66±8,34 ^A	22,02±6,51 ^A	19,59±6,69 ^A
EF	24,96±7,53 ^A	36,01±4,59 ^A	28,66±7,95 ^A	18,82±9,52 ^A
LHEF	11,61±4,49 ^B	18,61±3,78 ^B	24,92±4,06 ^A	14,67±4,56 ^A

Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$). LH: leite fermentado por *L. helveticus*; EF: leite fermentado por *Enterococcus faecium*; LHEF: leite fermentado por *L. helveticus* e *E. faecium*.

Fonte: Autoria própria.

A análise de FRAP mede a atividade antioxidante total e é baseada na habilidade da amostra de reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) para íon ferroso (Fe^{2+}), formando um complexo azul (SANTOS-SANCHEZ *et al.*, 2019). Os resultados das amostras de leite fermentado presentes na Tabela 7 indicam que para a amostra LH houve uma estabilidade dos valores durante o armazenamento, não apresentando diferença significativa entre as repetições ou dentro de cada repetição durante os dias. O mesmo comportamento foi observado na análise de DPPH.

No tratamento LHEF ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e durante os dias de armazenamento. Em todas as repetições foi observada a diminuição da atividade comparando o dia 1 ao dia 28. Apesar de ser esperado o aumento da atividade durante o armazenamento pela proteólise, substâncias resultantes ao final do processo de hidrólise enzimática podem atuar

como doadores de elétrons (agente redutor), convertendo as moléculas da amostra em substâncias mais estáveis e impedindo a ação como antioxidante (CORREA *et al.*, 2011).

Tabela 7 – Análise FRAP expresso em capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) e desvio padrão dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)

Tratamento	Repetição	Tempo de armazenamento (dias)			
		1	7	14	28
LH	1	520,65±1,03 ^{Aa}	510,21±1,57 ^{Aa}	648,71±36,50 ^{Aa}	535,18±27,50 ^{Aa}
	2	673,22±43,51 ^{Aa}	555,71±40,42 ^{Aa}	562,22±52,81 ^{Aa}	424,66±18,01 ^{Aa}
	3	555,12±23,91 ^{Aa}	599,19±8,56 ^{Aa}	543,20±49,02 ^{Aa}	434,29±29,51 ^{Aa}
LHEF	1	665,70±1,57 ^{Aa}	618,22±3,53 ^{Ab}	604,22±4,51 ^{Ab}	455,74±5,07 ^{Bc}
	2	651,78±14,05 ^{Aa}	555,21±11,59 ^{Bab}	502,2±32,41 ^{Ab}	492,2±13,50 ^{ABb}
	3	657,32±21,3 ^{Aa}	591,54±2,02 ^{ABab}	498,1±10,21 ^{Ac}	546,24±8,52 ^{Abc}
EF	1	499,45±36,25 ^{Aa}	541,21±64,52 ^{Aa}	623,12±24,50 ^{Aa}	620,20±24,50 ^{Aa}
	2	536,31±15,75 ^{Ab}	598,46±1,72 ^{Aab}	564,70±15,17 ^{Aab}	621,34±9,04 ^{Aa}
	3	601,72±73,01 ^{Aa}	674,77±4,03 ^{Aa}	675,18±27,09 ^{Aa}	605,26±88,51 ^{Aa}

Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).
 Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).
 LH: leite fermentado por *L. helveticus*; EF: leite fermentado por *Enterococcus faecium*; LHEF: leite fermentado por *L. helveticus* e *E. faecium*.

Fonte: Autoria própria.

O fermentado EF apresentou estabilidade nas repetições 1 e 3, não havendo interferência do tempo de armazenamento no poder antioxidante das amostras. Já a repetição 2 apresentou aumento significativo alcançando maior resultado no 28º dia. Segundo Nascimento (2017) no leite fermentado por *E. faecium* o tempo de estocagem e a concentração de metabólitos contribui para o aumento da capacidade antioxidante.

Comparando as médias dos tratamentos dentro de cada dia de análise, demonstradas pela Tabela 8, nos três primeiros tempos de análise os tratamentos apresentaram médias estatisticamente iguais, ocorrendo diferença apenas no 28º dia onde o tratamento EF apresentou maior média que os demais ($p < 0,05$). Este fato indica que apenas neste tratamento os compostos mantiveram sua capacidade antioxidante durante todo o período do experimento.

Tabela 8 – Análise FRAP expresso em capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) e desvio padrão comparando as médias dos diferentes tratamentos de leite fermentado durante o período de armazenamento (28 dias)

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)			
	1	7	14	28
LH	546,37±97,21 ^A	554,88±44,16 ^A	551,38±82,11 ^A	498,04±59,67 ^B
EF	545,86±45,02 ^A	604,77±47,01 ^A	621,12±44,98 ^A	615,38±40,67 ^A
LHEF	658,04±14,22 ^A	588,37±22,11 ^A	535,11±46,14 ^A	498,05±34,67 ^B

Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

LH: leite fermentado por *L. helveticus*; EF: leite fermentado por *Enterococcus faecium*; LHEF: leite fermentado por *L. helveticus* e *E. faecium*.

Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÃO

Os leites fermentados por *L. helveticus*, *E. faecium* e a junção de ambos se encontram em conformidade com a legislação brasileira com relação aos requisitos de composição proximal e contagem de microrganismos. Todos os tratamentos apresentaram manutenção da viabilidade celular mantendo valores de contagem acima de 8 ciclos logarítmicos durante os 28 dias de armazenamento. A atividade antioxidantes dos compostos presentes no produto fermentado com tratamento LH e EF se mantiveram em todo tempo de armazenamento, não ocorrendo o aumento da atividade como esperado. Já o tratamento LHEF apresentou queda na atividade antioxidante de todas as repetições para as análises de DPPH e FRAP, indicando que a utilização das duas espécies desfavoreceu a produção de compostos antioxidantes na amostra durante o armazenamento, acarretando consequentemente na diminuição da atividade.

REFERÊNCIAS

- AKIN, Z.; OZCAN, T. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. *Food Science and Technology*. v. 86, p. 25-30, 2017.
- ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ASPRI, M. *et al.* Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, v. 73, p. 1-9, 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed. Virginia, 2000.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 419-421, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 46 de 23 de outubro de 2007. o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**. 2007.
- BEGANOVIC, J. *et al.* Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, v. 20, p. 58–64, 2013.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n.4, p. 3611-3629, 2018.
- BRADSTREET, R.B. Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, v.26, p. 185-187, 1957.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, p.25-30, 1995.
- BROWN, M. R. W.; SCOTT-FOSTER, J. H. A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinic Pathology*, v.23, n.172, 1970.

BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products, *International Journal of Dairy Technology*, v. 50, n. 1, p. 21-27, 1997.

CARNEIRO, C. S. *et al.* Leites fermentados: histórico, composição, características físico-químicas, tecnologia de processamento e defeitos. *Pubvet*, v. 6, n. 27, p. 1423-1428, 2012.

CORRÊA, A. P. F. *et al.* Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of Science and Food Agriculture.*, v. 91, p. 2247–2254, 2011.

CREMONESI, P.; CHESSA, S.; CASTIGLIONI, B. Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, 2013.

DONNELLY, W. J. New functions of dairy products for human health. In: CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE, 9. **Tendências e avanços do Agronegócio de leite nas américas: mais leite = mais saúde**, Porto Alegre-RS, p.63-68, 2006.

DRAKE, M.A.; SWANSON, B.G. Reduced and low-fat cheese technology: a review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 366-369, 1995.

EL-SAYED, M. I.; AWAD, S.; ABOU-SOLIMAN, N. H. I. Improving the Antioxidant Properties of Fermented Camel Milk Using Some Strains of *Lactobacillus*. *Food and Nutrition Sciences*. v. 12, n. 4, 2021.

FERNANDES, R. **Microbiology handbook dairy products**. Leatherhead Publishing, Cambridge, 2009.

FERREIRA, C. L. L. F. Bactérias do ácido láctico como fermentos funcionais. *Revista Leite e Derivados*, São Paulo, n. 90, 2006.

FIGUEIREDO, E. L. **Enterococcus isolado de queijo Marajó, tipo creme: Caracterização tecnológica, cinética de multiplicação, capacidade de adesão e resistência a sanitizantes**. 82 f. Tese. (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

FRANZ, C. M. A. P. *et al.* Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 125–140, 2011.

FOULQUIÉ MORENO, M. R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, n. 1, p.1–24, 2006

FOX, P. F. *et al.* Cheese: Historical Aspects. In: _____. **Fundamentals of Cheese Science**. 2 ed. New York: Springer, 2017. p. 1-10.

FOX, P. F. *et al.* Chemistry and biochemistry of fermented milk products. In: _____. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2 ed. Springer, 2015.

FURLANETO-MAIA, L. *et al.* Isolation and characterization of potential probiotic enterococci strains from soft cheese flora. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 12, p.482–487, 2017.

GATTI, M. *et al.* Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n.2, p. 573-591, 2014.

GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion Microbiology*, v. 16, n. 1, p.10–16, 2013

GIRAFFA, G. *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. *Frontiers of Microbiology*, v. 5, 2014.

GONZALEZ-GONZALEZ, C. R. *et al.* Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 111, p. 449-456, 2019.

GRIFFITHS, M. W.; TELLEZ, A. M. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers of Microbiology*, v. 4, 2013.

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and functional foods: the foods for the future world. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, p. 2617-2627, 2016.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization of antioxidants. *Food Chemistry Toxicology*. v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995

INGOLF, F. N.; DAG, A. B.; DZUNG, B. D. Class II Non Lantibiotic Bacteriocins. In: ABBA, J. K. **Handbook of Biologically Active Peptides**. 2^a Ed. Academic Press, 2013.

HATI, S.; SAKURE, A.; MANDAL, S. Impact of proteolytic *Lactobacillus helveticus* MTCC5463 on production of bioactive peptides derived from honey based fermented milk. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 23, p. 297–303, 2017.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011

KORHONEN, H. J. Bioactive Components in Milk In: PARK, Y. W. **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**. Wiley-Blackwell: Iowa, USA, 2009, p. 15–42.

KIRK, R. S.; SAWYER, R. **Pearson's Composition and Analysis of Foods**, 9th Ed., London: Longman Scientific and Technical, 1991.

LA DEVRIESE, L. A. *et al.* Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 26, n. 2, p. 187-197, 1995.

LIMA, S. F. *et al.* **Características microbiológicas e antioxidantes de um novo alimento funcional probiótico: leite de ovelha fermentado por kefir.** In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUIMICA, 20., 2014, Florianópolis. Anais Florianópolis-SC, 2014.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, v.17, p. 23-32, 2000.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, v. 9, n. 9, 2017

MARTINS, N.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of Functional Dairy Foods. In: MÉRILLON, J. M.; RAMAWA, K. G. **Bioactive Molecules in Food, Reference Series in Phytochemistry.** New York: Springer International Publishing AG, 2018.

MELO, R. T. *et al.* *Lactobacillus helveticus* e sua importância na indústria de laticínios. *PUBVET*, v. 5, n. 9, 2011.

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

NASCIMENTO, L. C. S. **Seleção de novas linhagens de bactérias acidoláticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite.** 131f. Tese (Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2017

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa*, 2007.

SÁNCHEZ, B. *et al.* Probiotic fermented milks: Present and future. *International Journal of Dairy Technology*, v. 62, p. 472-483, 2009.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F. *et al.* Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In: SHALABY, E. **Antioxidants**, v. 5, iNtechOpen:London, 2019.

SAVAIANO, D. A.; HUTKINS, R. W. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review. *Nutrition Reviews*, v. 79, n. 5, p. 599–614, 2021.

SLATERRY, L. *et al.* Invited review: *Lactobacillus helveticus* — A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 10, p. 4435-4454, 2010.

SHIBY, V. K.; MISHRA, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, p. 482-496, 2013.

VINDEROLA, G.; MATAR, C.; PERDIGON, G. Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar *Typhimurium* infection in mice. *Immunobiology*, v. 212, p. 107–118, 2007.

VIRTANEN, T. *et al.* Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 106-115, 2007.

VLIEG, J. E.T. H.; HUGENHOLTZ, J. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for “flavours” and health benefits. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 1290-1297, 2007.

WHITTENBURY R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 35, p. 13-26, 1964.

YERLIKAYA, O.; ABKULT, N. *In vitro* characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of dairy technology*, v. 70, 2019.