

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**NATHASHA NORONHA ARECHAVALETA**

**PROSPECÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* LB1.5 EM PRODUTO  
LÁCTICO**

**Porto Alegre**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROSPECÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* LB1.5 EM PRODUTO  
LÁCTICO**

**Autor: Nathasha Noronha Arechavaleta**

**Trabalho apresentado à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
a obtenção da graduação em Medicina  
Veterinária**

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Amanda de  
Souza da Motta**

**Co-orientadora: Ma. Andréia Monique  
Lermen**

**Porto Alegre**

**2022**

NATHASHA NORONHA ARECHAVALETA

PROSPECÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* LB1.5 EM PRODUTO  
LÁCTICO

Aprovado em 07 de OUT de 2022

APROVADO POR:

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Amanda de Souza da Motta  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Monks Jantzen  
Membro da Comissão

---

Eng<sup>a</sup> Ambiental e Sanitarista Naiara Jacinta Clerici  
Membro da Comissão

*“I am among those who think that science  
has great beauty”*

Marie Curie

## AGRADECIMENTOS

Aos melhores pais que eu poderia ter, Jorge e Denise, por apoiarem minhas decisões e me encorajarem a seguir meus objetivos. Obrigada por me permitirem sonhar alto.

A minha avó, Alézia, pelo amor e colo de vó, por sempre comemorar minhas conquistas.

A minha querida avó Célia (*in memorian*) e ao meu primo Diógenes (*in memorian*), espero que estejam orgulhosos.

A minha enteada, Valentina, por todas as vezes que me fez explicar conteúdo da faculdade de forma simples e clara e por estudar no meu colo, inclusive, anatomia. Obrigada, por tornar minha vida mais leve.

Ao meu namorado, Marcos, pela paciência e apoio nos momentos difíceis, por todo o companheirismo, que aguentou todo o processo ao meu lado.

A minha melhor amiga, Priscila, por todo o apoio emocional durante toda a minha carreira acadêmica, sempre sendo o meu girassol. Obrigada por me incentivar a trocar o curso de graduação e acreditar no meu potencial.

As minhas companheiras caninas - Yumi, Pandora e Malô -, por permanecerem ao meu lado durante a pandemia e me distraírem nos momentos de estresse.

Aos meus irmãos e familiares, pelo incentivo, carinho, amor e apoio nessa jornada acadêmica.

A minha orientadora, Amanda, que teve papel fundamental no meu desenvolvimento acadêmico e profissional, muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos ao longo desses quatro anos de laboratório. Serei sempre grata pela oportunidade de desenvolvimento de pesquisas científicas.

A minha co-orientadora, Andréia, que nunca deixou de me ajudar.

Aos colegas do Laboratório 222c do ICBS – Andréia, Priscila e Victória -, por serem as melhores companheiras de bancada. Obrigada por deixarem o ambiente científico tão leve e não-competitivo.

A minha companheira de Trabalho de Conclusão de Curso e Iniciação Científica, Fernanda, obrigada por todos os momentos de carinho e amizade, por tornar esse período de estresse mais leve.

Aos professores e colegas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que propagam o conhecimento com excelência.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela qualidade de ensino que é proporcionada.

## RESUMO

Bactérias lácticas (BAL) possuem diversas aplicações na indústria de alimentos considerando o potencial tecnológico, o incremento de características sensoriais a produtos e capacidade probiótica de alguns isolados. O objetivo deste trabalho foi prospectar a aplicação de bactéria láctica probiótica, *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 proveniente de leite de búfala, visando o desenvolvimento de produto funcional, bem como, avaliar o efeito de polissacarídeo encapsulante (alginato de sódio) na viabilidade de *L. rhamnosus* LB1.5 em sorvete de leite de búfala. Para isso, o sorvete foi preparado e, posteriormente, foi adicionado a cultura probiótica em forma livre e microencapsulada. A viabilidade foi avaliada durante 60 dias, quando armazenadas à -18°C. Além disso, foram avaliadas a capacidade de acidificação do produto, a atividade antimicrobiana do isolado frente a indicadoras patogênicas e realizada análise bromatológica de três amostras de sorvete de leite de búfala com o probiótico livre e microencapsulado. Os resultados do estudo demonstraram possibilidade de associação da *L. rhamnosus* LB1.5 com culturas probióticas, capacidade de acidificação e atividade antimicrobiana frente a indicadoras patogênicas: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Foi demonstrada, ainda, a viabilidade do isolado em forma livre, cuja contagem manteve-se compatível com a concentração probiótica ( $10^6$  a  $10^9$  UFC/mL). Já o microencapsulado apresentou liberação variável, entre  $10^4$  UFC/mL e  $10^5$  UFC/mL. O sorvete de leite de búfala desenvolvido demonstrou ser um excelente veículo para adição de probióticos.

**Palavras-chave:** Bactéria ácido-láctica. Inocuidade. Produto funcional. Sorvete probiótico.

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have several applications in the food industry considering the technological potential, the increase of sensory characteristics to products and the probiotic capacity of some isolates. The objective of this work was to prospect the application of probiotic lactic acid bacteria, *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 from buffalo milk, aiming at the development of a functional product, as well as to evaluate the effect of encapsulating polysaccharide (sodium alginate) on the viability of *L. rhamnosus* LB1.5 in buffalo milk ice cream. For this, the ice cream was reconstituted and, later, it was added to the probiotic culture in free and microencapsulated form. Viability was evaluated for 60 days when stored at -18°C. In addition, the acidification capacity of the product, the antimicrobial activity of the isolate against pathogenic indicators were evaluated and a bromatological analysis of three samples of buffalo milk ice cream with the free and microencapsulated probiotic. The results of the study demonstrated the possibility of association of BAL with probiotic cultures, acidification capacity and antimicrobial activity against pathogenic indicators: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. It was also demonstrated the viability of the isolate in free form, whose count remained compatible with the probiotic concentration. The microencapsulated one presented variable release, between  $10^4$  and  $10^5$  CFU/mL. The buffalo milk ice cream developed proved to be an excellent vehicle for adding probiotics.

**Keywords:** Functional product. Innocuity. Lactic acid bacteria. Probiotic ice cream.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Método de Estria Radial. L = <i>L. rhamnosus</i> LB1.5; IPB = bactérias patogênicas.....	25
<b>Figura 2.</b> Média dos resultados de pH de caldo MRS, com <i>L. rhamnosus</i> LB1.5, incubado à 37 °C, por 48 h.....	30
<b>Figura 3.</b> Capacidade de coexistência entre <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 e bactérias comerciais ( <i>L. paracasei</i> LF e fermento Biorich®), demonstrando ausência de inibição de crescimento (sem halo), em ágar leite. Frente (a) e verso (b). ....	31
<b>Figura 4.</b> Avaliação de produção de EPS, em ágar Vermelho do Congo: resultado positivo de <i>L. rhamnosus</i> LB1.5. ....	32
<b>Figura 5.</b> Atividade antimicrobiana pelo método do líquido difuso, demonstrando efeito bacteriostático para as indicadoras (A) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 ( $10^8$ UFC/mL) e (B) <i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547 ( $10^6$ UFC/mL). ....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição química do leite de búfala, por diferentes autores. ....	16
<b>Tabela 2.</b> Capacidade antimicrobiana da <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 frente a indicadoras patogênicas.....	34
<b>Tabela 3.</b> Viabilidade celular de <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> LB 1.5 em sorvete comercial, à – 18°C, por 60 dias. ....	36
<b>Tabela 4.</b> Análise bromatológica do sorvete de leite de búfala em diferentes amostras. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bactéria(s) ácido-láctica(s)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
CRA	<i>Congo Red Agar</i>
EE	Eficiência de Encapsulação
EEA	Estação Experimental Agronômica
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli/ E.coli</i> Enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeos
g	Grama
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas da Saúde
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
mg	Miligramas
MH	<i>Müller Hinton</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MRS	<i>Man Rogorosa Sharpe</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monossódico
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
O.D	Densidade óptica
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada

RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
rpm	Rotação por minuto
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SLC	Sobrenadantes Livres de Células
T0	Tempo zero
TSB	Triptona de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UI	Unidade Internacional

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
μ	Micro
®	Marca registrada
™	<i>Trademark symbol</i>
°	Grau

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>14</b>
1.1.1	Objetivo Geral .....	14
1.1.2	Objetivos Específicos .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Leite bubalino: características e contexto microbiológico</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Funcionalidade de probióticos e matriz láctea</b> .....	<b>17</b>
2.2.1	Microrganismos probióticos e seus benefícios .....	18
2.2.2	Sorvete funcional .....	19
<b>2.3</b>	<b><i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Microencapsulação</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Microrganismos e condições de cultivo</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Leite de búfala</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Capacidade de acidificação do meio por <i>L. rhamnosus</i> LB1.5</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Coexistência entre <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 e culturas comerciais</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Produção de Exopolissacarídeo (EPS)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>Atividade antimicrobiana da <i>L. rhamnosus</i> LB 1.5</b> .....	<b>24</b>
3.6.1	Atividade antimicrobiana pelo Método de Estria Radial modificado.....	25
3.6.2	Atividade antimicrobiana pelo Método do Líquido difuso modificado .....	26
<b>3.7</b>	<b>Desenvolvimento de sorvete probiótico</b> .....	<b>27</b>
3.7.1	Cultivo da <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 .....	27
3.7.2	Microencapsulação da <i>L. rhamnosus</i> LB1.5.....	27
3.7.3	Preparo do sorvete .....	27
3.7.4	Manutenção de <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 em sorvete funcional .....	28
3.7.5	Avaliação da viabilidade da BAL em sorvete funcional .....	28
<b>3.8</b>	<b>Eficiência de Encapsulação (EE)</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Avaliação de pH do leite de búfala com <i>L. rhamnosus</i> LB 1.5 (livre e microencapsulada)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise bromatológica do sorvete funcional</b> .....	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Capacidade de acidificação do meio por <i>L. rhamnosus</i> LB1.5</b> .....	<b>30</b>

4.2	Coexistência entre as bactérias lácticas selecionadas .....	31
4.3	Produção de exopolissacarídeo (EPS) .....	32
4.4	Atividade antimicrobiana da <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 .....	33
4.5	Viabilidade celular de <i>L. rhamnosus</i> LB1.5 no sorvete funcional.....	36
4.6	Eficiência de microencapsulação .....	38
4.7	Avaliação do pH do leite de búfala com <i>L. rhamnosus</i> LB 1.5 (livre e microencapsulada).....	38
4.8	Análise bromatológica do sorvete funcional.....	39
5	CONCLUSÃO .....	41
6	REFERÊNCIAS.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias ácido-lácticas (BAL) compreendem o grupo de bactérias gram-positivas, bacilos, cocos ou cocobacilos, catalase negativa, não formadoras de endósporos produtoras de ácido láctico. São amplamente empregadas em alimentos, uma vez que apresentam características tecnológicas, tais como fermentação de lactose, atividade proteolítica e capacidade de acidificação do meio. Além disso, muitas espécies apresentam capacidade probiótica, que auxiliam no desenvolvimento de novos produtos alimentícios funcionais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Probióticos são microrganismos vivos, bactérias ou leveduras não patogênicos, que ao serem administrados ou consumidos em quantidades adequadas, conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014). Os probióticos podem ser veiculados à dieta humana por meio de diversas matrizes alimentares, com destaque para os produtos lácteos, como iogurte e bebidas lácteas. Além disso, devido a atual demanda da população por alimentos mais saudáveis, funcionais e com alto valor nutricional, busca-se o desenvolvimento de novos alimentos probióticos (BERNAL-CASTRO *et al.*, 2019; MARGALHO *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o leite de búfala ganha notoriedade por apresentar propriedades vantajosas para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais, uma vez que proporciona maior rendimento de produção se comparado com o leite bovino, além de possuir elevada quantidade de proteína, lactose, vitaminas, minerais, gordura, extrato seco e sólidos totais (PINTO *et al.*, 2018; BAILONE *et al.*, 2017; VERRUMA; SALGADO, 1994).

No âmbito dos produtos lácteos, o sorvete pode ser uma alternativa para incorporação de probióticos, uma vez que, além de uma excelente fonte de nutrientes, possui aceitabilidade por diferentes públicos e atende aos critérios de exigência de mercado, cada vez mais competitivo.

Logo, esse trabalho visou prospectar a aplicação de microrganismo probiótico *L. rhamnosus* LB1.5 em matriz láctica funcional, avaliando as propriedades antimicrobianas e tecnológicas do isolado.



## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

Explorar as propriedades de isolado probiótico, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 proveniente de leite de búfala, visando o desenvolvimento de sorvete funcional desta matéria-prima.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade antimicrobiana de bactéria ácido-láctica frente a bactérias indicadoras patogênicas.
- Promover a microencapsulação de isolado probiótico com alginato de sódio.
- Avaliar a viabilidade de *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 em matriz alimentar.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Leite bubalino: características e contexto microbiológico

O leite de búfala representa aproximadamente 14 % da produção mundial de leite, com população total de animais de 201,1 milhões (FAO, 2018). Essa população está concentrada no continente asiático (96,9 %), sendo o leite mais produzido, na Índia (CAVALI; PEREIRA, 2020).

No Brasil, a produção de leite bubalino vem aumentando, haja vista o interesse pelos consumidores em produtos com as vantagens nutricionais e características organolépticas marcantes presentes nos derivados desta matéria-prima. A Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) projeta o aumento anual de 10 % na produção de carne e de leite bubalino, já que os animais são caracterizados pela dupla aptidão (MIRANDA, 2021). A prospecção do desenvolvimento da bubalinocultura é justificada pela adaptabilidade e rusticidade desses animais que, associado ao avanço zootécnico, possibilita o aumento populacional a cada ano (LIMA *et al.*, 2014; BARRETO *et al.*, 2010).

O leite de búfala apresenta características que o diferenciam do leite produzido por outras espécies, uma vez que possui valor nutricional com elevado teor de gordura (6,85 a 8,16 %), proteína (3,68 a 4,50 %), minerais (cálcio 1,88 %, ferro 0,12 mg, fósforo 0,09 a 1,2 %, magnésio 0,18 %), vitamina A (204,27 UI), concentração reduzida de colesterol (214 mg) e aminoácidos essenciais, com valor elevado de ácido linoleico conjugado (CLA) (CAVALI; PEREIRA, 2020; VERRUMA; SALGADO, 1994). Em estudos realizados referentes a composição do leite bubalino, há variações em suas concentrações (Tabela 1), que podem ser justificadas devido ao tipo de manejo empregado, condições ambientais e individuais dos animais, como raça, idade e estágio de lactação (AMARAL *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; VARGAS-RAMELLA *et al.*, 2021; GODINHO *et al.*, 2020).

Entre outros fatores, o leite de búfala produzido no Brasil, apresenta crioscopia entre -0,531 e -0,548 °C, densidade entre 1,025 e 1,047 g/mL; pH entre 6,41 e 6,47; acidez entre 14 e 20 °D (HÜHN *et al.*, 1991). Além disso, a quantidade de caseína é maior quando comparado ao leite bovino, o que confere maiores valores de acidez, tendo em vista que os aminoácidos anfóteros constituintes dessa

proteína, são titulados como ácidos, no processo de acidimetria Dornic (FURTADO, 1980; HÜHN *et al.*, 1991).

**Tabela 1.** Composição química do leite de búfala, por diferentes autores.

<b>Autor</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>Lactose (%)</b>	<b>Sólidos Totais (%)</b>
<b>Amaral <i>et al.</i> (2004)</b>	4,19	6,83	4,93	17,19
<b>Coelho <i>et al.</i> (2004)</b>	4,20	6,83	5,02	17,23
<b>Godinho <i>et al.</i> (2020)</b>	4,06	5,5	5,07	15,5
<b>Hühn <i>et al.</i> (1982)</b>	3,68	6,8	3,83	17,50
<b>Lima <i>et al.</i> (2014)</b>	4,24	5,44	4,77	15,42
<b>Macedo <i>et al.</i> (2001)</b>	4,13	6,59	-	17,01
<b>Zanela <i>et al.</i> (2011)</b>	4,02	5,81	4,90	15,97
<b>Verruma e Salgado (1994)</b>	4,5	8,16	-	17,0

As características de composição conferem alto rendimento na produção de derivados como na elaboração de queijos, produtos fermentados, iogurte, doce de leite e sorvete (NERES *et al.*, 2013). Estudos relatam o alto rendimento em queijos produzidos com leite de búfala, quando comparados com a rentabilidade de produzidos com leite bovino: para a fabricação de 1 kg de queijo muçarela são necessários 5 a 8 L de leite bubalino ou 10 a 12 L de leite bovino (SILVA *et al.*, 2006); para produzir 1 kg de manteiga, são necessários 14 L de leite de búfala ou 20 L de leite bovino (LIMA *et al.*, 2014).

Quanto as características organolépticas, essa matéria-prima apresenta sabor adocicado e coloração branca, devido à ausência de  $\beta$ -caroteno em sua composição química, o que confere isso também aos produtos derivados (VERRUMA; SALGADO, 1994).

Apesar de diversos estudos quanto a composição físico-química do leite de búfala produzido no Brasil, até então, não há legislação federal específica que regulamente tais parâmetros de referência (DI DOMENICO, 2019), semelhante ao que ocorre com o leite bovino, no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Porém, existe a Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº 24, de 10 de janeiro de 2008, que regulamenta alguns parâmetros de identidade de leite de búfala produzido em São Paulo, o qual considera normal a presença de: 4,5 % de teor de gordura mínima, acidez entre 14 e 23 °D; pH entre 6,4 e 6,9; no mínimo, 8,57 % de extrato seco desengordurado; densidade entre 1,028 e 1,034 (à 15 °C) e índice crioscópico entre -0,520 e -0,570 (SÃO PAULO, 1994).

A importância do consumo do leite de búfala fluído ou de seus derivados, vai além da qualidade nutricional apresentada. Estudos demonstraram que pessoas alérgicas ao leite bovino, não apresentam a mesma reação inflamatória quando realizada a substituição pelo leite bubalino, o que é justificado pela ausência da proteína  $\beta$ -caseína A1, que é a responsável pelo desencadeamento de reações alérgicas (DE PAULA *et al.*, 2021; MISHRA *et al.*, 2009; SHEEHAN; PHIPATANAKUL, 2009).

O leite de búfala cru, antes do processo de pasteurização, contém uma população bacteriana diversificada, pois o seu alto teor de nutrientes e o pH quase neutro favorece o crescimento de muitas bactérias lácticas. Como já mencionado, bactérias ácido-lácticas são o principal grupo de probióticos, sendo *Lactocaseibacillus* e *Bifidobacterias* as mais conhecidas. Apesar de menos prevalentes, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* spp. também podem ser isolados (VARGAS-RAMELLA *et al.*, 2021). Inclusive, algumas bactérias lácticas isoladas de leite bubalino têm demonstrado capacidade probiótica, conforme demonstrado em estudo por Breyer *et al.* (2021). Porém, há poucos estudos publicados que explorem o potencial microbiológico de isolados desta matéria-prima (BREYER *et al.*, 2021; KURTZ *et al.*, 2021; VARGAS-RAMELLA *et al.*, 2021; GODINHO *et al.*, 2020; JERONYMO, 2013).

## 2.2 Funcionalidade de probióticos e matriz láctea

Alimentos funcionais são classificados como aqueles que, além de seu valor nutricional, são capazes de promover efeitos benéficos a saúde do consumidor, desempenhando redução ao risco de doenças degenerativas crônicas, como câncer, diabetes, entre outras. Dentre os principais produtos funcionais já estudados, encontram-se os produtos probióticos (MORAES; COLLA, 2006; SOUZA *et al.*, 2003).

A incorporação de probióticos na alimentação visa atender a demanda de consumidores que buscam uma vida mais saudável, uma vez que muitos estudos correlacionam o desequilíbrio na dieta com o desenvolvimento de doenças crônicas (ROLIM *et al.*, 2020; MORAES; COLLA, 2006).

Bactérias ácido-láticas inoculadas em iogurte de leite de búfala apresentaram melhores resultados relacionados a viabilidade celular, quando comparadas ao iogurte produzido a partir de leite bovino, inclusive, manteve-se a concentração correspondente à probiótico. Tal resultado demonstra a potencialidade funcional de incorporação da matéria-prima leite de búfala para desenvolvimento de produtos funcionais (SILVA *et al.*, 2020).

### 2.2.1 Microrganismos probióticos e seus benefícios

Probióticos são uma importante categoria de alimentos funcionais, definidos como “microrganismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas, oferecem benefícios a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Porém, para exercer tal efeito, devem tolerar o trato gastrointestinal e permanecer viáveis ao final do prazo de validade do alimento em concentração entre  $10^6$  e  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL (GANGULY *et al.*, 2019; HILL *et al.*, 2014). Conforme a FAO (2002), as bactérias com potencial probiótico devem também atender aos critérios de substância segura GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, ter ausência de fatores de virulência e patogenicidade, e serem sensíveis à antimicrobianos.

Estudos destacam o uso de probiótico como aliado a saúde humana e animal, sendo as bactérias probióticas amplamente empregadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* (ROLIM *et al.*, 2020; MARTINS *et al.*, 2019; HILL *et al.*, 2014).

O consumo regular de produtos probióticos promove a modulação do sistema imunológico, redução dos níveis de colesterol, regulação do sistema digestório, reduz episódios de rinite alérgica, tem efeitos benéficos associados a prevenção de câncer, entre outros (HILL *et al.*, 2014; VARGAS-RAMELLA *et al.*, 2021; COELHO *et al.*, 2016, VITETTA *et al.*, 2017; PAITÁN *et al.*, 2019; SURYANI, 2015; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2021). O sistema digestório é beneficiado pelo equilíbrio da microbiota “natural” e pela inibição de crescimento de bactérias patogênicas, uma vez que probióticos podem exercer efeito antimicrobiano por antagonismo ou interações competitivas (SHI *et al.*, 2020). Sendo assim, é recomendada a incorporação de microrganismos benéficos, uma vez que associados a nutrição adequada, conferem eficiência biológica aos sistemas imunológico e digestório (PATEL *et al.*, 2015).

Os probióticos estão disponíveis ao consumidor nos seguintes produtos: iogurtes, leites fermentados, formulações infantis, leite em pó, sobremesa láctea, incorporados a bebidas à base de soro de leite, sorvetes, queijos, cereais, sucos e produtos cárneos, entre outros (CRUZ *et al.*, 2017; SIMEONI *et al.*, 2014).

### 2.2.2 Sorvete funcional

A legislação brasileira, através da Portaria nº 379, de 29 de abril de 1999, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), que trata do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Bases para Gelados Comestíveis, define que o sorvete é uma sobremesa congelada elaborada basicamente com leite e/ou derivados lácteos, acrescido ou não de outras matérias-primas de origem não láctea. Conforme em seu Anexo 1, sorvete de leite tem a composição mínima de: 28 % de sólidos totais, 2,5 % de gordura láctea e 2,5 % de proteína de leite (BRASIL, 1999).

O Ministério da Saúde, através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 266, define de forma abrangente os gelados comestíveis como aqueles obtidos pela emulsão de gorduras e proteínas, ou aqueles elaborados a partir de água e açúcares que apresentem densidade mínima de 475 g/L (BRASIL, 2005).

Segundo a Cartilha de Boas Práticas de Fabricação na Indústria de Gelados do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2011), os sorvetes podem ser classificados conforme o teor de gordura em: *sorbet* (0 %

de gordura); *sherbert* (1 a 2 %), sorvete tradicional (6 a 10 %), sorvete *premium* (10 a 16 %) e sorvete *superpremium* (superior a 16 %). O teor de gordura está diretamente relacionado a cremosidade do produto.

O sorvete pode ser uma alternativa para incorporação de probióticos, uma vez que, além de uma excelente fonte de nutrientes, possui aceitabilidade por diferentes públicos e atende aos critérios de exigência de mercado, cada vez mais competitivo (AFZAAL *et al.*, 2019, ROY *et al.*, 2021).

### **2.3 *Lacticaseibacillus rhamnosus***

Bactérias ácido-lácticas são classificadas como bactérias gram-positivas, catalase negativas, coco ou bacilos não-esporulados, anaeróbicas facultativas ou microaerófilas, ácido-tolerantes; crescem a temperatura entre 10 °C e 45 °C e pH entre 4,0 e 4,5 (AHMED *et al.*, 2021; TORTORA *et al.*, 2017). Frequentemente são empregadas na indústria de alimentos, tendo em vista a incorporação de propriedades organolépticas e atuarem como culturas *starters* ou probióticas (MADERA *et al.*, 2003; TORTORA *et al.*, 2017).

Conforme a nova classificação taxonômica referentes as características genotípicas do gênero *Lactobacillus*, o qual 261 espécies foram subdivididas em 25 gêneros, sendo 23 gêneros novos, incluindo o gênero *Lacticaseibacillus* (ZHENG *et al.*, 2020; BRASIL, 2021). Sendo assim, os microrganismos classificados, anteriormente ao ano da publicação, como *Lactobacillaceae*, poderão continuar utilizando o termo genérico “lactobacilos”, conforme Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2021).

Cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* são amplamente estudadas e utilizadas como probióticos, por apresentarem capacidade de adesão e colonização, fatores determinantes para modulação do sistema imunológico (AHMED *et al.*, 2021; CAPURSO, 2019). Além disso, exibem capacidade antimicrobiana ao reduzirem a população de bactérias indesejáveis, pela redução do pH ou pela produção de metabólitos como peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e bacteriocinas (JERONYMO, 2013; BROMBERG *et al.*, 2006). No entanto, pesquisas são realizadas buscando-se aumentar a viabilidade destas bactérias em matrizes alimentares, uma vez que *L. rhamnosus* são naturalmente

sensíveis a variação de pH, enzimas, sais biliares e microbiota nativa (ÁLVAREZ *et al.*, 2022).

## 2.4 Microencapsulação

Microrganismos fastidiosos quando acrescidos em meios que proporcionam condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento, necessitam de tecnologias que os protejam do ambiente externo, mas que o mantenham viáveis, sendo a técnica de microencapsulação uma das mais empregadas (ETCHEPARE *et al.*, 2015).

Amplamente empregada na indústria, a técnica de microencapsulação consiste em aplicar um revestimento polimérico a partículas sólidas, gotículas líquidas ou material gasoso, formando cápsulas protetoras de tamanho reduzido que podem liberar o conteúdo protegido de forma controlada ou sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008; ETCHEPARE *et al.*, 2015). Dentre os materiais encapsulados, destacam-se os pigmentos, conservantes, enzimas, acidulantes e microrganismos (KAREL; LANGER, 1988). Quanto aos revestimentos que podem ser utilizados, há os hidrocoloides (ágar, alginato de sódio, carragena), carboidratos (dextrina e sacarose), derivados de celulose, lipídios, materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos); proteínas do glúten, ceras hidrofílicas ou lipofílicas, que são selecionados conforme as particularidades do material a ser encapsulado (FAVARIN, 2014).

Alginato de sódio é um biopolímero, extraído de algas, utilizado como agente encapsulador que retém células microbianas em uma matriz polimérica, tornando a estrutura semipermeável, o que promove a liberação controlada do conteúdo (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008). Além de microrganismos, cápsulas comestíveis podem ser empregadas em enzimas, nutrientes, acidulantes, pigmentos, aditivos de sabor, entre outros (FAVARIN, 2014). Dentre as vantagens da utilização do alginato como agente encapsulante, ressalta-se a não toxicidade do composto, a ausência de interação com o microrganismo, baixo custo, possibilidade de aplicação em escala industrial e aceitabilidade como aditivos de alimentos (SHEU; MARSHALL, 1993).

Existem diversas técnicas de proteção às partículas (sólidas, líquidas ou gasosas) como técnica da emulsão, emulsificação em fase contínua, leito



fluidizado, coacervação, liofilização, *spray dryer*, entre outras, que são selecionadas de acordo com a particularidade do material. Porém, a Técnica de Extrusão é uma das mais empregadas, e consiste em ejetar por uma seringa equipada com agulha, mistura de solução hidrocoloide (alginato de sódio) e solução de microrganismo, em solução desidratante (cloreto de cálcio), para endurecimento da cápsula (FAVARIN, 2014).

Conforme Afzaal *et al.* (2019), a encapsulação de probióticos com biopolímeros, como alginato de sódio, além de favorecer a viabilidade da cultura quando inserida a sorvete, aumenta a taxa de sobrevivência desta em condições simuladas do trato gastrointestinal, o que incentiva o desenvolvimento de outros produtos funcionais probióticos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Microrganismos e condições de cultivo

Bactérias lácticas foram isoladas de leite cru de búfala, proveniente de tanque de refrigeração de laticínio localizado no município de Cassino, Rio Grande do Sul, Brasil, entre os anos de 2007 e 2011. *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 foi selecionada quanto à inocuidade e ao potencial probiótico, haja vista a ausência de fatores de virulência e comprovada capacidade de adesão, agregação e tolerância às condições de simulação intestinal (BREYER *et al.*, 2021). Este isolado foi reativado em caldo de *Man Rogosa Sharpe* (MRS; Merck, Alemanha), suplementado com *Tween* 80 (Dinâmica, Brasil), à 37 °C, por 24 h e semeado em ágar MRS. Culturas comerciais foram empregadas neste estudo, tais como *Lactocaseibacillus rhamnosus* FAGRON™, *Lactocaseibacillus paracasei* (isolado de leite fermentado) e fermento comercial para preparo de iogurte (Biorich®, contendo *L. acidophilus* LA-5®, *Bifidobacterium* BB-12® e *Streptococcus thermophilus*). Estes isolados foram cultivados nas mesmas condições citadas acima.

As culturas indicadoras *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritides ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 foram reativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Oxoid, Inglaterra) e incubadas à 37 °C, por 48 h.

### 3.2 Leite de búfala

O leite de búfala utilizado neste estudo foi produzido pelo rebanho bubalino da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), localizado em Eldorado do Sul/RS.

O leite foi transportado sob refrigeração até o Instituto de Ciências Biológicas da Saúde (ICBS), onde foi transferido para frascos estéreis de *Schott* e aquecido a 110 °C, por 10 min, para esterilização. Após o resfriamento, com o auxílio de alça de platina, foi realizada a inoculação em placa MRS e *Plate Count Agar* (PCA; Kasvi, Itália), sendo incubadas a 37 °C, por 72h, para verificação da eficiência do processo de esterilização, pela ausência de crescimento bacteriano. O leite bubalino foi armazenado sob refrigeração, à 4 °C, por 48 h.

### 3.3 Capacidade de acidificação do meio por *L. rhamnosus* LB1.5

Para avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) de cultivo de *L. rhamnosus* LB1.5, 50 µL de pré-inóculo contendo a bactéria selecionada foi inoculado, em triplicata, em potes de coleta estéril contendo 5 mL caldo MRS. Os inóculos foram mantidos à 37 °C, por 48 h, e o pH foi avaliado nos tempos 0 h, 2 h, 6 h, 24 h e 48 h, por pHmetro digital (KASVI).

### 3.4 Coexistência entre *L. rhamnosus* LB1.5 e culturas comerciais

A avaliação de coexistência entre *L. rhamnosus* LB1.5 e as bactérias comerciais *Lactocaseibacillus paracasei* LF e o fermento láctico Biorich® foi realizada através do método da gota modificado, descrito por Motta *et al.* (2008).

Primeiramente, o isolado *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 foi inoculado em ágar MRS, à 37 °C, por 48 h. Após o período de incubação, com auxílio de alça de platina, retirou-se uma colônia deste cultivo para adição a tubo de vidro contendo 5 mL de solução salina 0,85 % Cloreto de Sódio (NaCl). A solução salina foi padronizada, conforme grau de turbidez, em 0.5 de Densidade Óptica (OD), comparando com o grau de turbidez da escala de McFarland, que corresponde a concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Essa solução foi espalhada, com o auxílio de suabe estéril, por toda a superfície de placa de ágar leite, em três direções.

As culturas comerciais utilizadas na avaliação de coexistência, *Lacticaseibacillus paracasei* LF e o fermento láctico comercial Biorich®, foram previamente inoculadas em 5 mL de caldo MRS, à 37 °C, por 48 h. A partir deste cultivo, retirou-se uma alíquota de 100 µL e adicionou-se a 10 mL de caldo MRS, o qual foi mantido em estufa, à 37 °C, por 48 h, para obtenção de concentração equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/mL. Posterior ao período de incubação, 1 mL do cultivo padronizado foi transferido para Eppendorf estéril, em triplicata, e submetido a centrifugação a velocidade de 10.000 rpm, durante 15 min. Separou-se, então, 900 µL do sobrenadante livre de células (SLC) em novo Eppendorf estéril, realizando etapa de mensuração de pH, com fita indicadora.

Uma alíquota de 20 µL de cada SLC de culturas comerciais foram acrescidas, em triplicata, em ágar leite contendo *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 previamente inoculada em superfície.

A placa foi incubada à 37 °C e, após 48 h, a capacidade de coexistência foi avaliada (SABO *et al.*, 2020). O resultado foi avaliado pela mensuração do diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm). O experimento foi realizado em triplicata.

### **3.5 Produção de Exopolissacarídeo (EPS)**

Para verificação de produção de exopolissacarídeos (EPS), *L. rhamnosus* LB1.5 foi inoculado por esgotamento, em ágar Vermelho do Congo (CRA; 37 g/L de caldo BHI, 50 g/L de sacarose, 10 g/L de ágar e 0,8g de vermelho congo), conforme descrito por Freeman *et al.* (1989), em triplicata, e incubada à 37 °C, por 72 h. Para controle positivo foi usado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (forte produtor de EPS) e cepa de *Bacillus* sp. (não produtora de EPS).

As cepas positivas para EPS produziram colônias de cor preta, enquanto, resultado negativo, apresentaram crescimento de colônias com coloração rosa (FREEMAN *et al.*, 1989).

### **3.6 Atividade antimicrobiana da *L. rhamnosus* LB 1.5**

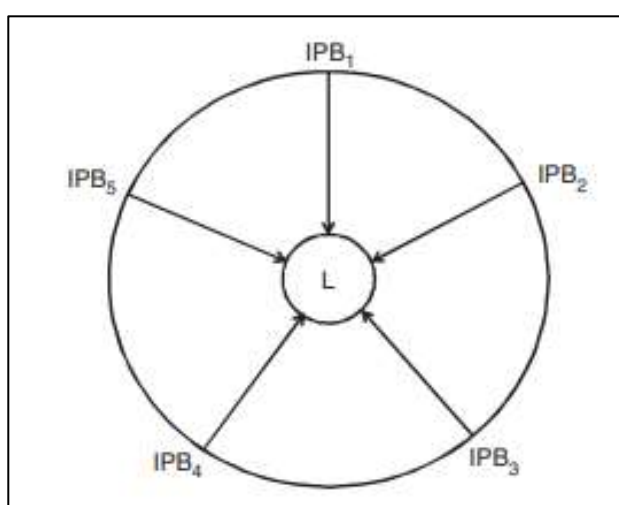
A avaliação da atividade antimicrobiana da bactéria ácido-láctica frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Corynebacterium fimi*

NCTC 7547 foi avaliada por dois métodos: Método de Estria Radial modificado (*radial streak method*) e pelo Método do Líquido Difuso modificado, ambos descritos por Coman *et al.* (2014).

### 3.6.1 Atividade antimicrobiana pelo Método de Estria Radial modificado

Na avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da estria radial, uma alíquota de 100  $\mu$ L de *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 foi inoculada em 10 mL de caldo MRS, mantido em estufa, à 37 °C, por 48 h, para obtenção de concentração equivalente a  $10^8$  UFC/mL de cultivo. Posteriormente ao período de incubação, o volume de 50  $\mu$ L deste cultivo foi acrescido ao centro de placa contendo ágar M17 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubado à 37 °C, por 48 h, em microaerofilia.

As bactérias indicadoras mencionadas foram cultivadas em placa ágar *Tryptone Soya Broth* (TSB; Oxoid, England), à 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação, foram realizadas suspensões das culturas patogênicas em solução salina 0,85 % de NaCl, conforme a Escala de McFarland de 0.5 (equivalente a  $10^8$  UFC/mL). Cada solução padronizada foi inoculada, com o auxílio de alça estéril descartável, de forma radial (da borda ao centro), conforme Figura 1, à placa contendo a BAL previamente preparada.



**Figura 1.** Método de Estria Radial. L = *L. rhamnosus* LB1.5; IPB = bactérias patogênicas.

Fonte: Imagem retirada de Comann *et al.* (2014).

As placas foram mantidas à 37 °C, em aerobiose, por 24 h. Posteriormente ao período de incubação, foram mensuradas as distâncias entre as colônias formadas. Este experimento foi realizado em triplicata.

### 3.6.2 Atividade antimicrobiana pelo Método do Líquido difuso modificado

No método do líquido difuso, as indicadoras *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 foram cultivadas em placa ágar TSB, à 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação, com o auxílio de alça de platina, uma colônia de cada foi acrescida a tubos individuais de 5 mL de solução salina 0,85 % NaCl, Dessa solução padronizada (de concentração equivalente a  $10^8$  UFC/mL), retirou-se uma alíquota de 100 µL que foi acrescida a Eppendorf contendo 900 µL de solução salina, para obtenção de microdiluição correspondente a  $10^7$  UFC/mL. Após homogeneização sob agitação, em vórtex, o processo foi repetido, para obtenção da concentração desejada,  $10^6$  UFC/mL.

Concluídas as etapas de diluição seriada, as soluções correspondentes a  $10^8$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL, de cada bactéria indicadora, foram inoculadas em superfície em placa de ágar *Müller Hinton* (MH; Difco™, França) em 4 direções, objetivando a formação de tapete.

Para preparação de inóculo de BAL, foi acrescido 100 µL de pré-inóculo de *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 a 10 mL de caldo MRS, que por sua vez, foi incubado à 37 °C, em microaerofilia, por 24 h. Após, foi retirado 1 mL de cultivo, em triplicata, o qual foi submetido a centrifugação, a 10.000 rpm, por 15 min. O volume de 900 µL de SLC, foi transferido para Eppendorf estéril e submetido a aquecimento até 80 °C, por 10 min, conforme descrito por Jeronimo (2013). Também, foi retirado uma alíquota de 100 µL do SLC para realização da contagem bacteriana, em PCA.

Uma alíquota de 20 µL de SLC de *L. rhamnosus* LB 1.5 foi acrescida em triplicata ao ágar *Müller Hinton*, de forma equidistante. Como controle, foi acrescido uma gota de mesmo volume de solução de 0,85 % NaCl ao ágar.

As placas foram mantidas à 37 °C, em aerobiose, por 24 h. Posteriormente ao período de incubação, foram mensurados os halos de inibição de crescimento em mm de diâmetro.

### 3.7 Desenvolvimento de sorvete probiótico

#### 3.7.1 Cultivo da *L. rhamnosus* LB1.5

A bactéria ácido láctica selecionada, *L. rhamnosus* LB1.5, foi inoculada e mantida em 5 mL caldo MRS, por 24 h, à 37 °C. Posteriormente, um volume de 500 µL do caldo MRS contendo a BAL foi adicionado a 50 mL de caldo MRS e mantido por mais 48 h, à 37 °C, para obtenção de inóculo de concentração equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/mL. Esse inóculo foi transferido para *falcon* estéril e submetido à centrifugação, em velocidade de 10.000 rpm, durante 15 min, para obtenção de *pellet* bacteriano para posterior aplicação em sorvete.

#### 3.7.2 Microencapsulação da *L. rhamnosus* LB1.5

A microencapsulação foi realizada conforme o método de Sheu *et al.* (1993), onde um volume de 500 µL do caldo MRS contendo a BAL foi adicionado a 50 mL de caldo MRS e mantido em estufa, à 37 °C, por 48 h. Esse inóculo foi submetido à centrifugação, a 2.000 xg, durante 10 min, à 4 °C, o sobrenadante foi descartado, sendo realizadas duas lavagens. Cada lavagem foi realizada com adição de 10 mL de água peptonada 0,1 % estéril, seguida de centrifugação (a 2.000 xg, 4 °C/10 min) e descarte do sobrenadante. O *pellet* bacteriano obtido foi ressuscitado em 25 mL de mesma solução.

O volume de 5 mL de suspensão de célula de *L. rhamnosus* LB1.5 foi adicionado à solução de Alginato de Sódio 2 %. Após a homogeneização em vórtex, por 2 min, essa mistura foi transferida para seringa estéril e, lentamente, ejetada através de agulha 0,45 mm, em 100 mL solução estéril de Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) a 0,05 M, suplementado com *Tween* 80 0,1 %. Através deste procedimento, foram obtidas microcápsulas de aproximadamente 1 mm de diâmetro contendo a BAL.

Após repouso de 30 min, as partículas encapsuladas foram submetidas a duas lavagens com água peptonada 0,1 % estéril. Por fim, mantiveram-se armazenadas em 100 mL água peptonada 0,1 % estéril, à 4 °C.

#### 3.7.3 Preparo do sorvete

Para a preparação do sorvete, 400 mL de leite de búfala esterilizado e refrigerado foi transferido para recipiente plástico e incorporado a 150 g de formulação comercial liofilizada de sorvete (Yoki<sup>®</sup>, sabor morango), por constante agitação, com auxílio de batedeira, conforme instruções do fabricante, sob condições assépticas.

#### 3.7.4 Manutenção de *L. rhamnosus* LB1.5 em sorvete funcional

O preparado foi dividido em três grupos para avaliação da viabilidade bacteriana: a amostra controle (G1) com 20 mL de sorvete; amostra G2, preparado de sorvete e *pellet* bacteriano de *L. rhamnosus* LB1.5 ( $10^8$  UFC/mL), obtido no item 3.7.1; a amostra G3 contém 20 mL de sorvete com *L. rhamnosus* LB1.5 microencapsulada, obtida conforme item 3.7.2.

As amostras foram subdivididas em microtubos, em triplicata, e submetidos a congelamento lento, em freezer, à -18 °C.

#### 3.7.5 Avaliação da viabilidade da BAL em sorvete funcional

A viabilidade de *L. rhamnosus* LB1.5 foi determinada durante a vida de prateleira do sorvete através de contagem de células viáveis pela técnica de microdiluição em PCA e MRS. Para tanto, cada amostra de sorvete (G1, G2 e G3) foi mantida em temperatura ambiente por 30 min e homogeneizada em vórtex, por 1 min. Posteriormente, 100 µL de cada amostra foi retirada para a realização de microdiluições seriadas até  $10^6$ , em 900 µL de solução salina 0,85 % NaCl estéril. Após homogeneização, 20 µL de cada microdiluição foi inoculada em ágar MRS e ágar PCA. Após 48 h de permanência das placas em estufa, à 37 °C, foram realizadas as contagens de UFC (GUERRA *et al.*, 2016). A avaliação da viabilidade foi realizada em triplicata e as amostras de sorvete foram analisadas antes do congelamento e nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias. O pH foi avaliado por fita indicadora de pH (escala 0-14, Merck<sup>®</sup>).

### 3.8 Eficiência de Encapsulação (EE)

Para a avaliação de eficiência de encapsulação, 1 g da microcápsula foi acrescentado em tubo contendo 9 mL de solução despolimerizadora (28 mL de solução fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (0,2 M) e 72 mL de solução fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (0,2 M), com ajuste de volume para 200 mL), para a liberação total da bactéria contida na cápsula, conforme descrito por Sheu e Marshall (1993). Após homogeneização em vórtex, foi realizada a microdiluição seriada para contagem (em UFC/ mL), 20  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi semeada em ágar MRS e PCA. A contagem foi realizada em triplicata e as placas foram incubadas à 37 °C, por 48 h.

O grau de eficiência foi obtido através da aplicação da Fórmula 01, em que N é o número de células viáveis liberadas da capsula e N0 é o número de células livres acrescidas ao biopolímero (MARTIN *et al.*, 2013).

$$\text{Eficiência de encapsulação (EE)} = \left( \frac{N}{N0} \right) \times 100 \quad (01)$$

### 3.1 Avaliação de pH do leite de búfala com *L. rhamnosus* LB 1.5 (livre e microencapsulada)

Para avaliação quanto a variação do pH do leite de búfala, 1 g de microcápsulas contendo *L. rhamnosus* LB1.5 ou 1 mL de *pellet* bacteriano de *L. rhamnosus* LB1.5 foi adicionado a coletor universal estéril contendo 9 mL de leite de búfala esterilizado, em triplicata. As amostras foram mantidas à -18 °C, por 20 dias. O volume de 10 mL de leite de búfala esterilizado foi mantido sob as mesmas condições de armazenamento, como amostra controle. A aferição da acidificação foi realizada por pHmetro digital portátil (KASVI™) previamente calibrado.

### 3.2 Análise bromatológica do sorvete funcional

Para a realização de análise bromatológica do sorvete produzido, o volume aproximado de 30 mL de cada amostra (G1, G2 e G3), foi armazenado à -18 °C, em duplicata, e encaminhado sob refrigeração ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA-UFRGS). Sendo assim, as amostras foram, inicialmente, pesadas e submetidas as análises de:

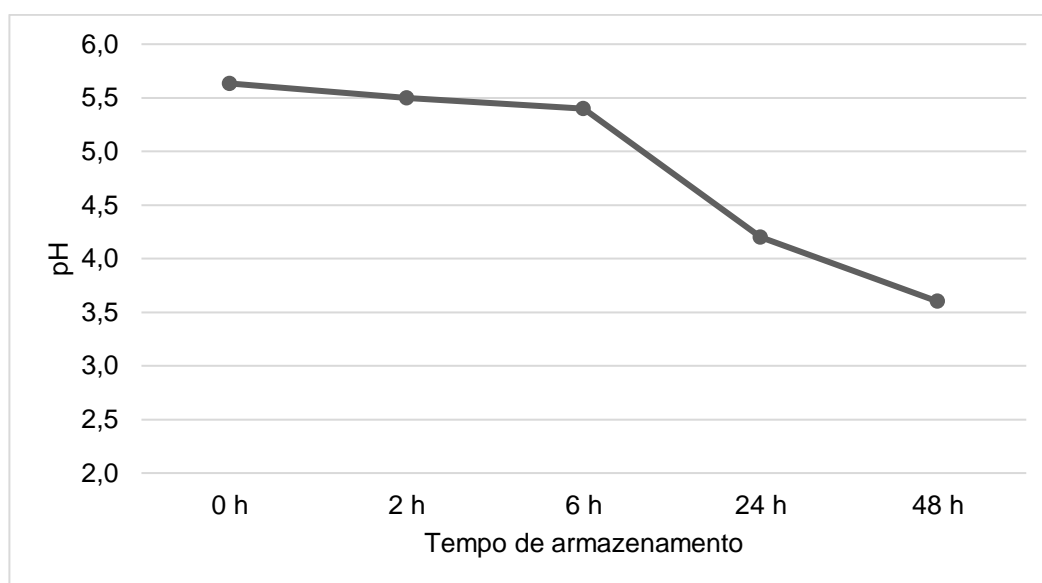


determinação de matéria seca, por termogravimetria; análise de teor de gordura total, pelo Método de Bligh e Dyer (1959); e concentração de proteína, pelo Método de Kjeldahl.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Capacidade de acidificação do meio por *L. rhamnosus* LB1.5

Durante o período de 48 h, foi observada a redução gradual do pH em que *L. rhamnosus* LB1.5 foi inoculada, em caldo MRS, à 37°C, por 48 h. Conforme observa-se na Figura 2, o pH inicial era de 5,6, mas houve uma redução significativa de pH (4,2) em 24 h e, após 48 h de incubação, o valor mínimo de pH foi observado (3,6).



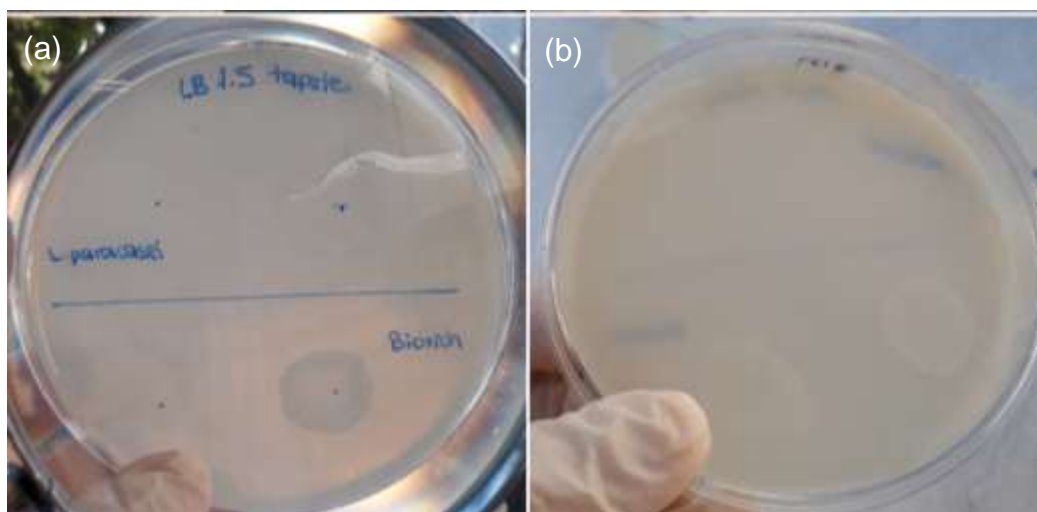
**Figura 2.** Média dos resultados de pH de caldo MRS, com *L. rhamnosus* LB1.5, incubado à 37 °C, por 48 h.

A capacidade de acidificação deste isolado mostrou-se superior ao apresentado por Leonarski *et al.* (2016), em que os isolados alcançaram pH 4,6, nas primeiras 24 h. Porém, Giazzi (2017) ao estudar diferentes BAL, demonstrou que isolados de *L. rhamnosus* apresentaram maior capacidade de acidificação, com valores de pH próximos a 3,9. A adição de BAL a meios nutrientes, confere degradação de açúcares, principalmente a lactose, em ácido lático, o que reduz o

pH do meio que é empregado, influenciando nas características organolépticas e tecnológicas do produto (LUNARDI *et al.* 2021).

#### 4.2 Coexistência entre as bactérias lácticas selecionadas

O isolado *L. rhamnosus* LB1.5 demonstrou capacidade de associação com as bactérias lácticas de uso comercial, haja vista a ausência de halo de inibição de crescimento (Figura 3a e 3b), tal resultado é desejável, uma vez que possibilita a aplicação conjunta de culturas com funcionalidades tecnológicas (*L. paracasei* LF e fermento Biorich®) e características probióticas (*L. rhamnosus* LB1.5).



**Figura 3.** Capacidade de coexistência entre *L. rhamnosus* LB1.5 e bactérias comerciais (*L. paracasei* LF e fermento Biorich®), demonstrando ausência de inibição de crescimento (sem halo), em ágar leite. Frente (a) e verso (b).

Câmara (2012), demonstrou, por inoculação cruzada, a capacidade de coexistência entre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* L1C1R5 e dois isolados (*L. paracasei* ssp. *paracasei* L1A1E3 e *L. plantarum* L1C1E6), o que permitiu avaliar a ocorrência de predominância de culturas adjuntas.

Ressalta-se que culturas probióticas são frequentemente associadas a outras estirpes comerciais, para interação de proto-cooperação entre microrganismos com o objetivo de acrescentar características tecnológicas, nutricionais ou terapêuticas ao produto (SACCARO, 2008). A exemplo disso, temos os iogurtes que são obtidos através do processo fermentativo de duas culturas *starters* empregadas de forma associada (*Streptococcus thermophilus* e

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Porém, para a fabricação de iogurte probiótico, há a necessidade de adição de cultura probiótica, uma vez que ambas as culturas *starters* são suscetíveis ao suco gástrico (SANTOS, 2012; SAARELA *et al.*, 2002).

#### 4.3 Produção de exopolissacarídeo (EPS)

O isolado *L. rhamnosus* LB1.5 demonstrou produção de EPS, através da metodologia de Freeman *et al.* (1989), com crescimento de colônias de coloração preta (Figura 4).



**Figura 4.** Avaliação de produção de EPS, em ágar Vermelho do Congo: resultado positivo de *L. rhamnosus* LB1.5.

Bactérias ácido-lácticas, como *L. mesenteroides* LB10.4 e três isolados de *L. lactis* (LB10.3, L4A8 e L4AN1), apresentaram resultados positivos para a produção de EPS, conforme ensaio realizado por Breyer (2020). Entretanto, nem todas as BAL expressam essa propriedade, conforme demonstrado por Mokhbi *et al.* (2009).

Conforme Bajpai *et al.* (2016), a investigação de produção de EPS por BAL tem sua importância na indústria, devido ao melhoramento de textura de alimentos, o aumento da estabilidade do microrganismo quando submetido ao congelamento

e a possibilidade de aplicação como espessante. Além disso, isolados de *Weissella* spp. demonstraram propriedades funcionais e tecnológicas associadas a produção de EPS, que possibilitaram o melhoramento de características sensoriais de produtos alimentícios (FESSARD; REMIZE, 2017). Apesar do mecanismo de atuação não estar totalmente esclarecido, sabe-se que a presença deste polímero, promove efeito protetor às células hospedeiras que contribuem para a expressão de propriedades probióticas (KORCZ; VARGA, 2021).

#### 4.4 Atividade antimicrobiana da *L. rhamnosus* LB1.5

Os probióticos são capazes de produzir substâncias que possuem efeito inibitório frente a bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos, tais como bacteriocinas, peróxidos de hidrogênio e ácidos orgânicos, como o ácido lático e o ácido acético, que reduzem o pH intestinal, ou desfavorecem o crescimento bacteriano, por exclusão competitiva (COSTA *et al.*, 2012; ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2021). Devido a sua importância, a inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos é uma das principais propriedades investigadas em culturas probióticas (LECLERCQ *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2012).

Neste estudo, a atividade antimicrobiana da *L. rhamnosus* LB1.5 avaliada através do método da estria radial modificado, demonstrou a capacidade antimicrobiana frente as cinco indicadoras testadas (Tabela 2), apresentando atividade bio-protetora frente a *S. aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, com distância média entre a indicadora e o isolado igual a 12 mm. Também foi observado atividade inibitória para as linhagens patogênicas testadas, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536 e *S. Enteritidis* ATCC 13076, cuja média da distância foi de 8 mm.

Resultados semelhantes foram apresentados por Coman *et al.* (2014), em que *L. rhamnosus* IMC 501, demonstrou inibição frente a diversas indicadoras gram-positivas e gram-negativas, incluindo: *Listeria monocytogenes* 306, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* DSM 1103, *E. coli* EPEC IMV1, *Salmonella* Enteritidis DSM 14221.

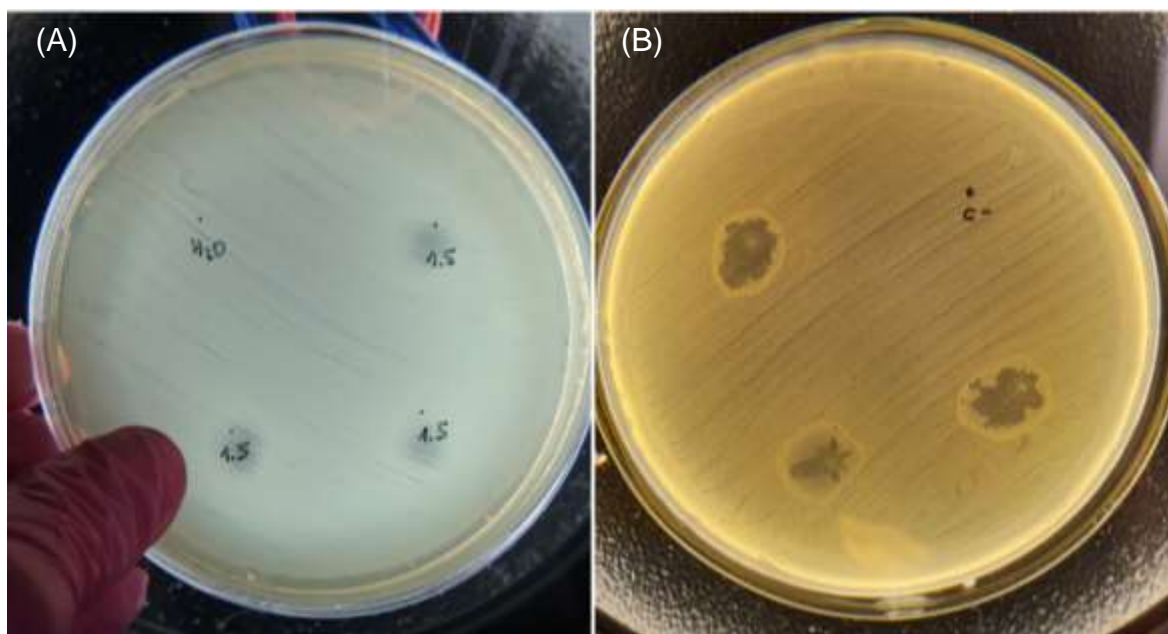
Entretanto, na avaliação pelo Método do líquido difuso modificado, foi observada a presença de halo de inibição de crescimento somente para a indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 ( $10^6$  UFC/mL), com valor médio de 4

mm de diâmetro. Foi observado efeito bacteriostático frente as *indicadoras* *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, na concentração de  $10^8$  UFC/mL, uma vez que houve redução do crescimento de colônias na presença de BAL, conforme Figura 5 (A) e (B).

**Tabela 2.** Capacidade antimicrobiana da *L. rhamnosus* LB1.5 frente a indicadoras patogênicas.

Indicadoras	Método Estria Radial distância média	Método do Líquido Difuso	
		$10^8$ UFC/mL	$10^6$ UFC/mL
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	12 mm	N.O*	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	8 mm	N.O	N.O
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	8 mm	N.O*	N.O
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	8 mm	N.O	N.O
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12 mm	N.O	N.O

Legenda 1. Sem presença de halo de inibição de crescimento (N.O); \* presença de efeito bacteriostático



**Figura 5.** Atividade antimicrobiana pelo método do líquido difuso, demonstrando efeito bacteriostático para as indicadoras (A) *L. monocytogenes* ATCC 7644 ( $10^8$  UFC/mL) e (B) *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 ( $10^6$  UFC/mL).

Efeitos inibitórios, semelhantes ao observado através do método do líquido difuso, foram demonstrados em diversos estudos que investigaram a capacidade antagonista de bactérias lácticas frente a cepas patogênicas. Por exemplo, Mirkovic *et al.* (2020) demonstraram o potencial antimicrobiano de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* frente a cepas de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, em queijo fresco. Enquanto isso, Rotta *et al.* (2020) relataram o efeito inibitório de *L. paracasei* 2.9 e *L. casei* 2.11 a espécies de *E. faecium*, *S. aureus* e *E. coli*; já, resultados obtidos por Salehizadeh *et al.* (2020), demonstraram o efeito antagônico de cepas de *Lactobacillus* frente a indicadoras *E. coli* e *S. typhimurium*, com formação de halo de inibição de crescimento superiores a 10 mm. Cabe ressaltar que a maioria dos estudos demonstram a atividade inibitória de bactérias lácticas frente a gram-positivas, tendo em vista que essas são mais sensíveis as bacteriocinas produzidas por BAL, devido a formação de poros nas membranas citoplasmáticas, que levam a violação celular (ONDA *et al.*, 2003; AMMOURI; REKIK, 2019).

A aplicação de diferentes métodos de avaliação de atividade antagonista permite a observação de mecanismos antimicrobianos distintos (COMAN *et al.*, 2014). Sabe-se que BAL expostas a ambientes com diferentes concentrações de oxigênio (aerobiose, anaerobiose ou microaerofilia) respondem utilizando

diferentes rotas metabólicas, o que influencia no índice de inibição (COSTA *et al.*, 2012; CONDON, 1987). Estudos dirigidos por Sakamoto e Komagata (1996) demonstraram que há maior produção de lactato quando as BAL são cultivadas em anaerobiose, entretanto, na presença de oxigênio, ocorre maior produção de acetato. Além disso, fatores como alta temperatura estão relacionados com a produção de bacteriocinas pela ativação de proteases, devido ao estresse térmico provocado (MESSENS *et al.*, 2003).

#### 4.5 Viabilidade celular de *L. rhamnosus* LB1.5 no sorvete funcional

A viabilidade da cultura probiótica foi determinada durante a vida de prateleira do sorvete, ao longo de 60 dias. Para tanto, foram realizadas contagens de células viáveis de *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 a cada 10 dias em ágar MRS. A qualidade higiênico-sanitária de preparação do sorvete foi determinada pela técnica de contagem, em ágar PCA, e os resultados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Viabilidade celular de *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 em sorvete comercial, à – 18°C, por 60 dias.

	Tempo (dias)	MRS (UFC/mL)	PCA (UFC/mL)
<b>G1</b>	0	0	0
	10	0	0
	20	0	0
	30	0	0
	40	0	0
	50	0	0
	60	0	0
<b>G2</b>	0	1,51 x 10 <sup>8</sup>	1,68 x 10 <sup>8</sup>
	10	9,33 x 10 <sup>7</sup>	1,26 x 10 <sup>8</sup>

	20	$4,92 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
	30	$1,2 \times 10^7$	$1,48 \times 10^7$
	40	$1,09 \times 10^7$	$1,74 \times 10^7$
	50	$1,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
	60	$1,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
<b>G3</b>	0	$2,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
	10	$7,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$
	20	$2,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
	30	$2,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
	40	$1,1 \times 10^5$	$8,6 \times 10^4$
	50	$6,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
	60	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$

Legenda 2. Amostra de sorvete contendo *L. rhamnosus* LB1.5 livre (G2); amostra de sorvete contendo *L. rhamnosus* LB1.5 microencapsulado (G3).

Conforme os resultados obtidos, a contagem de células viáveis de amostra contendo *L. rhamnosus* LB1.5 em forma livre, realizada antes do congelamento, foi de  $1,51 \times 10^8$  UFC/mL, em meio de cultivo seletivo (ágar MRS). Os valores deste probiótico em alimento lácteo mantiveram-se com concentração média de  $10^7$  UFC/mL, para os 60 dias observados. Essa concentração está de acordo com a legislação brasileira, que recomenda a concentração média de probióticos entre  $10^6$  e  $10^9$  UFC/mL (BRASIL, 2018).

Durante o período de armazenamento, a contagem do probiótico microencapsulado manteve-se entre  $2,1 \times 10^4$  UFC/mL e  $7,1 \times 10^5$  UFC/mL, apesar de mostrar-se abaixo das doses recomendadas, ao término desta avaliação, foi realizada nova contagem com método de liberação por solução despolimerizadora, o que comprovou a Eficácia de Encapsulação (EE), com contagem final igual a  $2,12 \times 10^7$  UFC/mL. Já no grupo controle (amostra contendo sorvete) não foi observado crescimento bacteriano no período avaliado.

Quanto à avaliação de acidificação, antes do congelamento, e durante os 60 dias de experimento, o pH manteve-se igual a 6 para todos os grupos, o que condiz



com o método de conservação e a matéria-prima utilizada, uma vez que o leite de búfala cru esterilizado possui valor médio de pH igual a 6,65 (BORGES *et al.*, 2009). Sabe-se que bactérias lácticas, em condições de incubação (à 37°C), demonstram alta capacidade de acidificação do leite, conforme demonstrado por Franciosi *et al.* (2009). Porém, a conservação pelo método de congelamento é uma alternativa para redução da atividade microbiana, uma vez que reduz a atividade metabólica de microrganismos e retarda reações químicas e enzimáticas, o que proporciona maior vida de prateleira de produtos alimentícios (SOLA *et al.* 2012; VASCONCELOS; MELO, 2016)

#### **4.6 Eficiência de microencapsulação**

As contagens do número de células de *L. rhamnosus* LB1.5 livre e após a microencapsulação com alginato de sódio 2 % foram de  $1,62 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,12 \times 10^7$  UFC/mL, respectivamente. A taxa de EE obtida foi de 89,16 %, o que demonstra que não houve prejuízo significativo de viabilidade da cultura ao final do processo de microencapsulação. O resultado encontrado foi superior ao encontrado por Kurtz *et al.* (2021), que em concentração semelhante de biopolímero, obteve valor máximo de 87,32 % (*L. rhamnosus*) e que ao final do processo de microencapsulação, obteve valor de EE de 80,74 % para *E. faecium* M7AN10. No entanto, a taxa de eficiência do presente estudo apresentou valor semelhante ao encontrado por Favarin (2014), cujo máximo de EE foi próximo a 90 %, ao adicionar mel ao processo de microencapsulação. Outro estudo, conduzido por Rosa *et al.* (2013), utilizaram mistura de ácido gálico e xantana, e obteve valor máximo superior de EE, totalizando 91,07 % de eficiência.

#### **4.7 Avaliação do pH do leite de búfala com *L. rhamnosus* LB 1.5 (livre e microencapsulada)**

As amostras de leite de búfala contendo *L. rhamnosus* LB 1.5 (livre e microencapsulada), armazenadas à -18°C, por 20 dias, demonstraram durante o período de observação, valor médio de pH igual a 7, bem como, a amostra controle manteve pH semelhante, durante todo o período observado, tal resultado se aproxima do valor encontrado por Hühn *et al.* (1982) e por Furtado (1980), cujo

valor aproximava-se da neutralidade, entre 6,43 e 6,80. Além disso, a estabilidade pode ser justificada pela condição de armazenamento (-18°C), uma vez que o congelamento é um método de conservação eficiente.

#### 4.8 Análise bromatológica do sorvete funcional

As análises de determinação de matéria seca, teor de gordura total e concentração de proteína, foram realizadas nas três amostras de sorvetes (G1, G2 e G3), em triplicata. Conforme resultados médios apresentados em Tabela 4, o menor valor de proteína foi observado em G3 (2,24 %). Já, para as demais amostras (G1 e G2), os valores de proteína foram semelhantes (3,3 %).

Não há estudos publicados que avaliem a composição físico-química de sorvete de leite de búfala, no Brasil, que possibilitem uma ampla análise comparativa de resultados. Porém, o desenvolvimento de gelado comestível a base de leite de búfala, com diferentes concentrações de linhaça e quitosina, conduzido por Chinellato (2008) analisou a composição centesimal deste produto, tendo valores médios de proteína superiores aos encontrados no presente experimento (6,50 %), e valores aproximados referentes a umidade 70,21 % e gordura 4,83 %.

**Tabela 4.** Análise bromatológica do sorvete de leite de búfala em diferentes amostras.

	G1	G2	G3	Comercial
<b>Gordura</b>	6,00 %	4,23 %	3,28 %	-
<b>Umidade</b>	68,27 %	68,89 %	80,83 %	-
<b>Gordura Extrato Seco</b>	18,92 %	13,6 %	17,06 %	18 %
<b>Proteína</b>	3,33 %	3,26 %	2,24 %	4,3 %

Legenda 3. Amostra de sorvete sem probiótico (G1); amostra contendo *L. rhamnosus* LB1.5 livre (G2); amostra de sorvete contendo *L. rhamnosus* LB1.5 microencapsulado (G3); sorvete *Buffalo Milk Ice Cream* (Comercial).

A produção de derivados de leite de búfala encontra-se em desenvolvimento no país, sendo diferentes tipos de queijos os produtos mais disponíveis no mercado. Já, o sorvete de leite de búfala limita-se a produção e comercialização em escala reduzida e/ou familiar (CARRERA, 2019; GLOBO REPÓRTER, 2022).

Em contrapartida, em outros países como a Inglaterra, Nova Zelândia, Filipinas e Estados Unidos, há produção comercial de sorvetes *gourmet* cuja base é o leite bubalino. Conforme apresentado na Tabela 4, o sorvete *Buffalo Milk Ice Cream*, produzido e comercializado na Inglaterra, apresentou valor superior de proteína, quando comparado às amostras G1, G2 e G3. Mas, quanto ao teor de gordura, as amostras G1 e G3 apresentaram teores próximos ao descrito pelo fabricante do sorvete comercial.

Destaca-se que os sorvetes analisados neste estudo, obtiveram resultado de teor de gordura suficiente para a classificação como sorvete *premium* (SEBRAE, 2011) e atende a concentração mínima de proteína atendendo ao determinado pela Portaria nº 379, de 29 de abril de 1999, da ANVISA.

## 5 CONCLUSÃO

O sorvete demonstrou ser um bom veículo para a adição de microrganismo probiótico. Além disso, durante o período de armazenamento, constatou-se que a cultura probiótica (*L. rhamnosus* LB1.5) manteve concentração adequada para a sua funcionalidade ao longo dos 60 dias de experimento. Apesar de estudos demonstrarem as vantagens de aplicação de métodos de microencapsulação com alginato de sódio para o aumento da vida de prateleira de produtos, em decorrência do curto período de avaliação, não foram demonstradas tais vantagens, nas condições experimentais estudadas.

*L. rhamnosus* LB1.5 apresentou efeito bioprotetor frente a indicadores patogênicos, o que demonstrou a importância de incorporação de probióticos para auxiliar a biossegurança alimentar. Bem como, foi demonstrada a capacidade de produção de exopolissacarídeo, por esse microrganismo.

Por fim, foi demonstrada a possibilidade de associação do *L. rhamnosus* LB1.5 a culturas comerciais (*starters*) e alta capacidade de acidificação, o que contribui para a realização de novos estudos, tendo como finalidade a elaboração de produtos fermentados lácteos com culturas proto-cooperativas.

## 6 REFERÊNCIAS

AFZAAL, M.; SAEED, F.; ARSHAD, M. U.; NADEEM M.T.; SAEED M.; TUFAIL T. The effect of encapsulation on the stability of probiotic bacteria in ice cream and simulated gastrointestinal conditions. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 1348-1354, 2019.

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

AHMED, R. A.; KAMIL, M. T.; KAMAL, L. D.; SOOR, H.; AHMED, T. The Mechanisms of *Lactobacillus* Activities: Probiotic Importance of *Lactobacillus* Species. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences E. Medical Entomology & Parasitology**, v. 13, p. 45-63, 2021.

ALBUQUERQUE, A. P.; RODRIGUES, T. J. A.; CAVALCANTE NETO, J. L.; ROCHA, A. P. T. Utilization of powdered fruit pulp probiotic loaders as a functional food: general aspects and perspectives. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, e2019310, 2021.

ÁLVAREZ, P.B.; ÁVILA, M. G.; ANDREWS, H. E. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. **LWT**, v. 153, 2022.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N. Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Rev Inst Lat Cândido Tostes**, v. 59, p. 37-41. 2004.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; RENALDI, F. B. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2005.

AMMOURI, K.; REKIK, S. **Isolement et purification de bactéries lactiques productrices de bactériocines a partir de produits laitiers**. Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri, 2019.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; LIMA, E. M. F.; PALCICH, G.; NUNES, T. P.; SOUZA, K. L. O.; MARTINS, C. G.; NODA, P. K.; DESTRO, M. T.; PINTO, U. M. *Listeria monocytogenes* inhibition by lactic acid bacteria and coliforms in Brazilian fresh white cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 847-858, 2021.

BAILONE, R. L.; BORRA, R. C.; ROÇA, R. O.; AGUIAR, L. D.; HARRIS, M. Qualidade do leite cru refrigerado de búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*) em diferentes fazendas e estações do ano no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, 2017.

BAJPAI, V. K.; RATHER, I. A.; MAJUMDER, R.; SHUKLA, S.; AERON, A.; KIM, K.; KANG, S. C.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K.; LIM, J.; PARK, Y. H. Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-23, 2016.

BARRETO, M.L.J.; RANGEL, A.H.N.; ARAÚJO, V.M.; BEZERRA, K.C.; MEDEIROS, H.R.; OLIVEIRA, J.P.F.; ANDRADE, K.D. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (CCS), a produção, o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 6, n. 2, p. 47-53, 2010.

BERNAL-CASTRO, C. A.; DÍAZ-MORENO, C.; GUTIÉRREZ-CORTÉS, C. Inclusion of prebiotics on the viability of a commercial *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* culture in a tropical fruit beverage. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 2, 987-994, 2019.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORGES, K. C.; MEDEIROS, A. C. L.; CORREIA, R. T. P. Iogurte de leite de búfala sabor Cajá (*Spondias lútea* L.). Caracterização físico-química e aceitação sensorial, entre indivíduos de 11 a 16 anos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 295-300, 2009.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. Alteração taxonômica de linhagens de lactobacilos – perguntas e respostas. 2021 Disponível em: <<[Alteração taxonômica de linhagens lactobacilos — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](http://www.gov.br)>>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, nº144, Seção 1, p. 141-154, 27 Jul. 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. Regulamento Técnico referente a Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Base Comestíveis. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. Diário Oficial da União, Brasília.

BREYER, G. M.; ARECHA VALETA, N. N.; SIQUEIRA, F. M.; MOTTA, A. S. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, p. 468-483, 2021.

BREYER, G. M. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite de búfala**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu

efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

CÂMARA, S. P. D. A. **Estudo do potencial bioactivo e tecnológico de bactérias do ácido láctico isolado de queijo do Pico artesanal**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Angra do Heroísmo, Universidade dos Açores, 2012.

CAPURSO, L. Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 53, p. S1-S41, 2019.

CARRERA, J. Natureza e cultura centenária colocam o Marajó na rota do turismo nacional e internacional. Marajó e seus encantos, Rede Pará, 30 de outubro de 2019. Disponível em: <<Natureza e cultura centenária colocam o Marajó na rota do turismo nacional e internacional - REDEPARÁ (redepara.com.br)>>. Acesso em: 17 de setembro de 2022.

CAVALI, J.; PEREIRA, R. G. A. Produção leiteira de búfalos. In: SALMAN, A. K. D.; PFEIFER, L. F. M. Pecuária leiteira na Amazônia. Brasília, DF: Embrapa, p. 391-399, 2020.

CHINELATE, G. C. B. **Gelado comestível à base de leite de búfala com ingredientes funcionais: aplicação de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e quitosina**. Dissertação (mestrado), Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 2008.

COELHO, K. O.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L. D.; CORASSIN, C. H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automatizados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 167-170, 2004.

COELHO, M. D. G.; RAMOS L. L.; PEREIRA, R.B.; ROCHA, L. O.; LINO, F. P. S.; COELHO, F. A. S. Avaliação do consumo de *Lactobacillus casei* Shirota para



controle de giardíase em crianças. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 45, n. 2, p. 169-178, 2016.

COMAN, M. M.; VERDENELLI, M. C.; CECCHINI, C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; BOYKO, N.; CRESCI, A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®), *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYNBIO(®) against pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n.2, p. 518-527, 2014.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 3, n. 3, p. 269-280, 1987.

COSTA, G. N.; SUGUIMOTO, H. H.; DA SILVA MIGLIORANZA, L. H.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifodobacterium* frente a microrganismos patogênicos “*in vitro*”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.

CRUZ, A. G. D.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F. D.; CORASSIN, C. H. Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. Rio de Janeiro – RJ – Brasil: Elsevier Editora Ltda, 2017.

DE PAULA, I. L.; TEIXEIRA, E. B. S.; FRANCISQUINI, J. A.; STEPHANI, R. P.; CARVALHO, A. F.; OLIVEIRA, L. F. C. Buffalo powder dairy products with and without lactose hydrolysis: Physical-chemical and technical-functional characterizations. **LWT**, v. 151, 112-124, 2021.

DI DOMENICO, V. L. **Qualidade do leite cru de búfala armazenado sob temperatura controlada por um período de até 7 dias**. Monografia de conclusão de graduação – Faculdade de Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2019.

ETCHEPARE, M. A.; BARIN, J. S.; CICHOSKI, A. J.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. D. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, 2015.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2002.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food safety risk analysis**. An overview and framework manual. Rome, 2018. Disponível em: <[www.fao.org/docrep/i9166e/i9166e\\_Chapter 6 Meat.pdf](http://www.fao.org/docrep/i9166e/i9166e_Chapter 6 Meat.pdf)>.

FAVARIN, L. **Microencapsulação de *Bifidobacterium* spp pela técnica da emulsão em alginato de sódio: efeito de diferentes concentrações de mel**. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, p.71, 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FESSARD, A.; REMIZE, F. Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation? **Fermentation**, v. 3, p. 38, 2017.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International dairy journal**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of clinical pathology**, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.

FURTADO, M. M. Leite de búfala: estudo da fabricação do queijo azul. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 35, n. 207, p. 23-28, 1980.

GANGULY, S.; SABIKHI L.; SINGH A. K. Effect of whey-pearl millet-barley based probiotic beverage on *Shigella*-induced pathogenicity in murine model. **Journal of Functional Foods**, v. 54, p. 498-505, 2019.

GIAZZI, A. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2017.

GLOBO REPÓRTER. Sorvete feito com leite de búfalo é uma das delícias do Vale do Café. Disponível em: <<Globo Repórter | Sorvete feito com leite de búfalo é uma das delícias do Vale do Café | Globoplay>>. Acesso em 10 de setembro de 2022.

GUERRA, A. F. Métodos de contagem microbiana. Valença, 1ª Edição, p. 28, 2016.

GODINHO, F. M. S.; KRUG, M.; FIGUEIREDO, R.P.; MÜLLER, A.; JANK, L.; TOMASZEWSKI, C. A.; HILLESHEIM, D. R.; KINAST, E. J.; FRAZZON, A. P. G.; MOTTA, A. S. Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 4, p. 463-468, 2020.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, J. C.; MARTÍNEZ-TAPIA, A.; LAZCANO HERNÁNDEZ, G.; GARCÍA-PÉREZ, B. E.; CASTREJÓN-JIMÉNEZ, N. S. Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 979, 2021.

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

HÜHN, S.; GUIMARÃES, M. C. F.; NASCIMENTO, C. N. B.; MOURA CARVALHO, L. O. D.; MOREIRA, E. D.; LOURENÇO JUNIOR, J. B. Estudo comparativo da composição química do leite de zebuínos e bubalinos. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1982, p. 15. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 36).

HÜHN, S.; LOURENÇO JÚNIOR, J. de B.; MOURA CARVALHO, L. O. D. de; NASCIMENTO, C. N. B. do; VIEIRA, L. C. Características, peculiaridades e tecnologias do leite de búfalas. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1991. 51 p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 57), 1991.

JERONYMO, A. B. O. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias ácido lácticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2013.

KAREL, M.; LANGER, R. Controlled release of food additives. **ACS Symposium Series**, v. 370, p. 177-191, 1988.

KORCZ, E.; E VARGA, L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 375-384, 2021.

KURTZ, J. N. P.; PAIM, W. P.; JANTZEN, M. M.; MOTTA, A. S. The probiotic properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from buffalo milk: food matrix studies. **Journal of clinical nutrition and food science**, v. 4, p. 17-29, 2021.

LECLERCQ, S.; MIAN, F. M.; STANISZ, A. M.; BINDELS, L. B.; CAMBIER, E.; BEN-AMRAM, H.; KOREN, O.; FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.

LEONARSKI, E.; OLIVEIRA, J.; CUNHA, V. L.; RAMOS, C. J. R.; PASSOS, C. T. Investigação da capacidade de acidificação de bactérias ácido l ticas (BAL) isoladas de leite orgânico cru. Fórum Internacional Cátedra Iberoamericana-suiza de Desarrollo de Medicamentos – X CISDEM, 2016.

LIMA, T. C. C.; NASCIMENTO RANGEL, A. H.; SOUZA MACÊDO, C.; ARAÚJO, T. P. M.; ARAÚJO, V. M.; LIMA JÚNIOR, D. M.; MURMANN, L.; NOVAES, L. P. Composição e qualidade do leite e do soro do leite de búfalas no estado do Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 1, p. 25-30, 2014.

LUNARDI, A.; DANTAS FILHO, J.V.; FERREIRA, C.C.; CAVALI, J.; VAIS, J. O., DE ASSIS DIAS, A.; GASPAROTTO, P. H. G. Bactérias  cido-l ticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio   indústria do queijo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021.

MACEDO M. P.; WECHSLER F. S.; RAMOS A. A.; AMARAL J. B.; SOUZA J. C.; RESENDE F. D.; OLIVEIRA J. V. Composição Físico-Química e Produção do Leite de Búfalas da Raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1084-1088, 2001.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANZEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213 – 222, 2003.

MARGALHO, L. P.; FELICIANO, M. D. E.; SILVA, C. E.; ABREU, J. S.; PIRAN, M. V. F.; SANT'ANA, A. S. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of non starter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety

properties—Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 7908-7926, 2020.

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT-Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 480-486, 2013.

MARTINS, A.; RAMOS, H; LOPES, N. Uso do probiótico na prevenção da diarreia associada a antibiótico em pacientes hospitalizados: uma revisão não sistemática. **Braspen Journal**, v. 34, n. 1, p. 100-108, 2019.

MESSENS, W.; VERLUYTEN, J.; LEROY, F.; DE VUYST, L. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. **International journal of food microbiology**, v. 81, n. 1, p. 41-52, 2003.

MIRANDA, R. Laticínios de leite de búfala conquistam espaço no Brasil. Uai Agro, 31 de julho de 2021. Disponível em: <Laticínios de leite de búfala conquistam espaço no Brasil – Uai Agro>. Acesso em: 01 de setembro de 2022.

MIRKOVIC, N.; KULAS, J.; MILORADOVIC, Z; MILJKOVIC, M.; TUCOVIC, D.; MIOCINOVIC, J.; JOVCIC, B; MIRKOV, I; KOJIC, M. *Lactolisterin* BU-producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1-4: Bio-control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh soft cheese and effect on immunological response of rats. **Food Control**, v. 111, p. 107076, 2020.

MISHRA, B. P.; MUKESH, M.; PRAKASH, B.; SODHI, M.; KAPILA, R.; KISHORE, A.; KATARIA, R. R.; JOSHI, B. K.; BHASIN, V.; RASSOL, T. J.; BUJARBARUAH, K. M. Status of milk protein,  $\beta$ -casein variantes among Indian milch animals. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 79, n. 7, p. 722-725, 2009.

MOKHBI, A.; KAID-HARCHE, M.; LAMRI, K.; REZKI, M.; KACEM, M. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains for their use as starter cultures in Algerian olive fermentations. **Grasas y aceites**, v. 60, n. 1, p. 82-88, 2009.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOTTA, A. S.; FLORES, F. S.; SOUTO, A. A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 3, p. 275–284, 2008.

NERES, L. S.; PACHECO, E. A.; LOURENÇO-COSTA, V. V.; LIMA, S. C. G.; NAHÚM, B. S.; GARCIA, A. R. Qualidade do requeijão cremoso de leite de búfalas suplementadas com subprodutos agroindustriais, em Belém, Pará. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 391, p. 24-31, 2013.

ONDA, T.; YANAGIDA, F.; TSUJI, M.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. **International journal of food microbiology**, v. 87(1-2), p. 153-159, 2003.

PAITÁN, E.; SANTOS, R.; SOTELO, A.; ZÚÑIGA, D.; VÍLCHEZ, C. Molecular characterization of bacteria with probiotic potential isolated from stool of human neonates. **Revista Peru biology**, v. 26, n. 1, p. 119-130, 2019.

PATEL, S.; SHUKLA, R.; GOYAL, A. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 549– 561, 2015.

PINTO, E. G.; PEREIRA, M. C.; SOARES, D. S. B.; FERNANDES, A. P. S. Desenvolvimento de logurtes de Leite de Búfala e Cabra Sabor Açaí. **Uniciências**, v. 22, nº 3Esp., p. 7-10, 2018.

ROLIM, F. R. L.; NETO, O. C. F.; OLIVEIRA, M. E.; OLIVEIRA, C. J. B.; QUEIROGA, R. C. R. E. Cheeses as food matrixes for probiotics: *in vitro* and *in vivo* tests. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, p. 138-154, 2020.

ROSA, C. G.; BORGES C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; NUNES, M. R.; BENVENUTTI, E. V.; LUZ, S. R.; D'AVILA, R. F.; RUTZ, J. K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. **Industrial crops and products**, v. 46, p. 138-146, 2013.

ROTTA, I. S.; DA MATTA, M. F.; DOS SANTOS, C. T. B.; PAIVA, A. D.; MACHADO, A. B. F. Bactérias do ácido láctico potencialmente probióticas isoladas de leite não pasteurizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 178-189, 2020.

ROY, S.; HUSSAIN, S. A.; PRASAD, W. G.; KHETRA, Y. Effect of emulsifier blend on quality attributes and storage of high protein buffalo milk ice cream. **LWT**, v. 150, p. 111903, 2021.

SAARELA, M.; LÄHTEENMÄKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods—the European perspective. **International journal of food microbiology**, v. 78(1-2), p. 99-117, 2002.

SABO, S. D. S.; MENDES, M. A.; ARAÚJO, E. D. S.; MURADIAN, L. B. A.; MAKIYAMA, E. N.; LEBRANC, J. G.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; KNÖBL, T.; OLIVEIRA, R. P. D. S. Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-14, 2020.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado** - Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, 2008.



SAKAMOTO, M.; KOMAGATA, K. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Ishikawa, v. 82, n. 3, p. 210-216, 1996.

SALEHIZADEH, M.; MODARRESSI, M. H.; MOUSAVI, S. N.; EBRAHIMI, M. T. Evaluation of lactic acid bacteria isolated from poultry feces as potential probiotic and its in vitro competitive activity against *Salmonella typhimurium*. In Veterinary Research Forum, v. 11, n 1, p. 67, 2020.

SANTOS, P. P. D. S. **Desenvolvimento de gelado comestível probiótico**. Dissertação (mestrado), Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia, 2012.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento – SAA. Resolução SAA nº 24 de 01 de agosto de 1994. Cap.7, Artigo 134. 1994.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Cartilha de boas práticas de fabricação na indústria de gelados comestíveis. 1ª Ed, p. 72, SEBRAE – Belém, 2011.

SHEEHAN, W. J.; PHIPATANAKUL, W. Tolerance to water buffalo milk in a child with cow milk allergy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 102, n. 4, p. 349, 2009.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of *lactobacilli* in calcium alginate gels. **Journal of food science**, v. 58, n. 3, p. 557-561, 1993.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of dairy Science, Champaign**, v. 76, n. 7, p. 1902-1907, 1993.

SHI, S.; QI, Z.; JIANG, W.; QUAN, S.; SHENG, T.; TU, J.; SHAO, Y.; QI, K. Effects of probiotics on cecal microbiome profile altered by duck *Escherichia coli* 17 infection in Cherry Valley ducks. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 1-8, 2020.

SILVA, M. S. T.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; MIRANDA, H.; ERCHESEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J. A.; COSTA, J. M. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores, 2006. Disponível em:< [http://www.cpatu.br/Bufalo/paginas/pronaf\\_bufalos](http://www.cpatu.br/Bufalo/paginas/pronaf_bufalos)>. Acesso em: 20 de agosto de 2022.

SILVA, T. M. S.; PIAZENTIN A. C. M.; MENDONÇA, C. M. N.; CONVERTI, A.; BOGSAN, C. S. B.; MORA, D.; OLIVEIRA, R. P. S. Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 7890-7897, 2020.

SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. D. A.; MENEZES, C. R. D.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulation of Probiotics: Technological Innovation in The Food Industry. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 66–75, 2014.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. D.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Bioesfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398, 2012.

SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO; M. A.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia em Alimentos**. Campinas, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SURYANI, L. The effect of supplementation probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota L against colonization of *Staphylococcus aureus* nasal swab isolates from patients with allergic rhinitis. **KnE Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 124-128, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12 ed. Artmed editora, p. 935, 2017.

VARGAS-RAMELLA M.; PATEIRO M.; MAGGIOLINO A.; FACCIA M.; FRANCO D.; DE PALO P.; LORENZO J. M. Buffalo Milk as a Source of Probiotic Functional Products. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2303, 2021.

VASCONCELOS, M. A. S.; MELO FILHO, A. B. Conservação de Alimentos. Programa Escola Técnica Aberta do Brasil, Recife: EDUFRPE, 2016.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola** [online], v. 51, n. 1, p. 131-137, 1994.

VITETTA, L.; SALTZMAN, E.; THOMSEN, M.; NIKOV, T.; HALL, S. Adjuvant Probiotics and the Intestinal Microbiome: Enhancing Vaccines and Immunotherapy Outcomes. **Vaccines**, v. 5, n. 50, p.1-17, 2017.

ZANELA, M. B.; KOLLING, G. J.; VAZQUEZ FERNANDEZ, V. N.; RIBEIRO, M. E. R.; CANELLAS, L. C.; LOPES, F. P. N.; PEREIRA, K. P. Composição química do leite de búfala. Embrapa Clima Temperado. Conferencia Internacional sobre Leche Inestable. Colonia: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay, p. 65, 2011.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M.B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GÄNZLE, M. G.; LEBEER, S. 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*. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2020.