

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DO LEITE E DERIVADOS**

MICHELY FREITAS BESSA

**INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICAS, BIOATIVAS E MICROBIOLÓGICAS DE LEITE FERMENTADO**

JUIZ DE FORA

2020

MICHELY FREITAS BESSA

**INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICAS, BIOTIVAS E MICROBIOLÓGICAS DE LEITE FERMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito final à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mirian Pereira Rodarte

Coorientadores: Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro

Prof<sup>a</sup>. Dra. Martha Eunice de Bessa

JUIZ DE FORA

2020

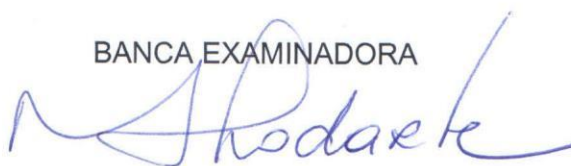
Michely Freitas Bessa

**INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICAS, BIOTIVAS E MICROBIOLÓGICAS DE LEITE FERMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito final à obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 13 de agosto de 2020

BANCA EXAMINADORA



---

Prof.ª. Dr.ª. Mirian Pereira Rodarte - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

pl Prof.ª. Dr.ª. Elita Scio Fontes  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

pl Prof.ª. Dr.ª. Elisângela Michele Miguel  
EPAMIG/ILCT

Dedico aos meus pais, Maurício e Edmara, pelo constante investimento no meu conhecimento e educação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por sempre se mostrar presente em minha vida, me dando forças e sabedoria para enfrentar os desafios ao longo dessa trajetória.

Aos meus amados pais, Edmara e Maurício, pelo constante apoio e amor incondicional.

À minha avó Lígia, pelos ensinamentos, amor e dedicação. Aos meus avós Maurício, Aloysio e Ester que sempre estarão presentes em meu coração e à minha família por vibrarem com as minhas conquistas.

Ao Lucas, pelo companheirismo, lealdade, paciência, amor e por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos.

Às minhas amigas, por entenderem minha ausência e por contribuírem nesta dura e gratificante caminhada, oferecendo apoio, companheirismo, alegrias e cumplicidade: Thalita, Isabela, Lidiane, Gabriela, Mariana, Maria Thereza, Amanda, Alessandra e Fernanda.

À minha querida orientadora, Mirian Rodarte, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança em mim depositada e pelas palavras de apoio nos momentos difíceis.

Aos meus coorientadores Martha Bessa e Humberto Húngaro, pelo auxílio e oportunidade de me desenvolver profissionalmente.

Agradeço, especialmente, à Martha Bessa e à Ana Flávia Werneck pela amizade que construímos, pelo carinho que tiveram comigo ao longo dessa trajetória e por me ajudarem na realização desse projeto.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados por permitirem a realização desta pesquisa.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para realização deste trabalho, em especial: Jansen, João Paulo, João Pablo, Geissy, Nathália Kalifi, Monique Rezende, Felipe Gomes e toda a equipe do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA), meu muito obrigado!

## RESUMO

Os leites fermentados apresentam um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos com propriedades benéficas à saúde. O extrato de café verde apresenta diversas atividades biológicas, podendo ser utilizado como ingrediente na indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de extrato de café verde (*Coffea arabica* L.) na viabilidade microbiana, propriedades físico-químicas e bioativas, coloração e sinérese de um leite fermentado probiótico. Os leites fermentados foram produzidos utilizando *Lactobacillus casei*. A caracterização do extrato de café verde, bem como do leite fermentado, com e sem extrato, foi realizada por meio da determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e pelo método sistema  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico e análise espectroscópica no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR-MIR). As análises físico-químicas, colorimétrica, sinérese e a viabilidade do *Lactobacillus casei* foram avaliadas nos leites fermentados após a fermentação e durante o armazenamento a 4°C. A adição de extrato de café verde em leite fermentado propiciou um aumento da atividade antioxidante do produto sem que houvesse a perda da viabilidade da bactéria láctica utilizada. Além de manter a viabilidade, a utilização do extrato permitiu uma maior multiplicação bacteriana. O extrato de café verde mostrou-se promissor para a produção de leite fermentado com ingredientes naturais bioativos.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; *Lactobacillus*; Fenólicos.

## ABSTRACT

Fermented milks present great potential for the development of new products with properties beneficial to health. The green coffee extract has several biological activities and can be used as an ingredient in the food industry. The objective of this work was to evaluate the influence of the addition of green coffee extract (*Coffea arabica* L.) on microbial viability, physical-chemical and bioactive properties, color, and syneresis of probiotic fermented milk. The fermented milks were produced using *Lactobacillus casei*. The characterization of green coffee extract, as well as fermented milk, with and without extract, was carried out by determining the antioxidant activity by the method of sequestration of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) and by the system method  $\beta$ - carotene / linoleic acid and spectroscopic analysis in the medium infrared with Fourier transform (FTIR-MIR). Physical-chemical, colorimetric, syneresis and viability analyzes of *Lactobacillus casei* were evaluated in fermented milks after fermentation and during storage at 4°C. The addition of green coffee extract in fermented milk provided an increase in the antioxidant activity of the product without losing the viability of the lactic bacteria used. In addition to maintaining viability, the use of the extract allowed greater bacterial development. The extract of green coffee has shown promise for the production of fermented milk with natural bioactive ingredients.

Keywords: *Coffea arabica* L.; *Lactobacillus*; Phenolics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química dos ácidos cafeoilquínicos	20
Figura 2	Fluxograma do processo de elaboração do leite fermentado com extrato de café verde	29
Figura 3	Contagem do <i>Lactobacillus casei</i> LAFTI- L26 durante o armazenamento do LF-CE e do LF-SE	36
Figura 4	Atividade antioxidante pelo método DPPH do leite fermentado sem extrato de café verde ao longo da vida de prateleira	39
Figura 5	Atividade antioxidante pelo método DPPH do leite fermentado com extrato de café verde ao longo da vida de prateleira	40
Figura 6	Atividade antioxidante pelo método DPPH do leite fermentado com e sem extrato de café verde	41
Figura 7	Atividade antioxidante pelo método $\beta$ - caroteno/ácido linoleico do leite fermentado sem extrato de café verde ao longo da vida de prateleira	42
Figura 8	Atividade antioxidante pelo método $\beta$ - caroteno/ácido linoleico do leite fermentado com extrato de café verde ao longo da vida de prateleira	43
Figura 9	Comparativo da atividade antioxidante pelo método $\beta$ - caroteno/ácido linoleico do leite fermentado com e sem extrato de café verde	44
Figura 10	Espectro FTIR-MIR dos leites fermentados e do extrato de café verde	45
Figura 11	ACP aplicada às amostras de leite fermentado com adição de extrato de café verde ao longo do armazenamento	48
Figura 12	ACP aplicada às amostras de leite fermentado sem adição de extrato ao longo do armazenamento	49
Figura 13	ACP aplicada às amostras de leite fermentado com e sem adição de extrato de café verde	50



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade antioxidante do extrato de café verde pelos métodos DPPH e $\beta$ -caroteno / ácido linoleico	33
Tabela 2	Análises físico-químicas do leite fermentado com e sem adição de extrato de café verde	35
Tabela 3	Valores médios dos parâmetros de cor das amostras de LF-SE e LF-CE durante 21 dias de armazenamento	51

## LISTA DE SIGLAS

ACGs: Ácidos clorogênicos

3-ACQ: Ácido 3-O-cafeoilquínico

4-ACQ: Ácido 4-O-cafeoilquínico

5-ACQ: Ácido 5-O-cafeoilquínico

APC: Análise de componentes principais

ATR: Reflectância Total Atenuada, do inglês Attenuated Total Reflectance

BALs: Bactérias ácido lácticas

DPPH: Método de Sequestro de Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FTIR-MIR: Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier, do inglês Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy

LF-CE: Leite fermentado com adição de extrato de café verde

LF-SE: Leite fermentado sem adição de extrato de café verde

LST: Caldo lauril sulfato triptose

NMP: Método do número mais provável

PDA: Ágar Batata Dextrose

UFC/mL: Unidade formadora de colônias/ mililitro

VBB: Caldo verde bile brilhante

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>14</b>
2.1	LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS	14
<b>2.1.1</b>	<b>Leite fermentado</b>	<b>16</b>
2.2	EMPREGO DE EXTRATOS VEGETAIS EM PRODUTOS LÁCTEOS	16
2.3	CAFÉ VERDE	18
<b>2.3.1</b>	<b>Composição química dos grãos de café verde</b>	<b>19</b>
2.4	BACTÉRIAS LÁTICAS	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.1	MATERIAIS	26
4.2	MÉTODOS	26
4.2.1	<b>Preparo do extrato de café verde</b>	<b>26</b>
4.2.2	<b>Caracterização do extrato de café verde</b>	<b>27</b>
4.2.2.1	<i>Atividade antioxidante do extrato de café verde</i>	27
4.2.2.2	Análise espectroscópica no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR-MIR)	28
<b>4.2.3</b>	<b>Produção do leite fermentado</b>	<b>28</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Análises físico-químicas e microbiológicas</b>	<b>29</b>
4.2.4.1	<i>Composição Centesimal</i>	29
4.2.4.2	<i>Análises Microbiológicas</i>	30
<b>4.2.5</b>	<b>Avaliação da viabilidade das bactérias lácticas</b>	<b>31</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Atividade antioxidante do leite fermentado</b>	<b>31</b>
4.2.6.1	<i>Determinação da atividade antioxidante pelo Método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)</i>	31
4.2.6.2	<i>Determinação da atividade antioxidante pelo Método Sistema <math>\beta</math>-caroteno/ácido linoleico</i>	31
<b>4.2.7</b>	<b>Análise espectroscópica no infravermelho médio com</b>	<b>32</b>

	<b>transformada de Fourier (FTIR-MIR)</b>	
<b>4.2.8</b>	<b>Análise colorimétrica</b>	<b>32</b>
<b>4.2.9</b>	<b>Análise de sinérese</b>	<b>32</b>
<b>4.2.10</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DO CAFÉ VERDE</b>	<b>33</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE FERMENTADO</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>VIABILIDADE DA CULTURA PROBIÓTICA</b>	<b>36</b>
<b>5.4</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO LEITE FERMENTADO</b>	<b>38</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante pelo Método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)</b>	<b>38</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante pelo Método Sistema <math>\beta</math>- caroteno/ácido linoleico</b>	<b>42</b>
<b>5.5</b>	<b>ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-MIR)</b>	<b>45</b>
<b>5.6</b>	<b>ANÁLISE COLORIMÉTRICA DOS LEITES FERMENTADOS</b>	<b>51</b>
<b>5.7</b>	<b>ANÁLISE DE SINÉRESE</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão atentos à composição dos produtos alimentícios e buscam cada vez mais alimentos que forneçam benefícios à sua saúde (GALLINA et al., 2012). O leite fermentado é um produto lácteo amplamente consumido também por apresentar seus efeitos benéficos. Diferentes tipos ou variedades de leites fermentados são desenvolvidos, visando atender à preferência dos consumidores que estão mais conscientes em relação aos seus hábitos alimentares e buscam alimentos mais saudáveis (SANCHEZ et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011; SANTOS et al., 2011; COSTA et al., 2013).

As tendências atuais de produção de alimentos incluem a introdução de produtos que tenham propriedades benéficas à saúde. As crescentes evidências de que dietas que incluem substâncias fenólicas podem trazer benefícios para a saúde dos consumidores propiciou um avanço em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos (DZIKI et al., 2015).

Dentre os alimentos que apresentam elevados teores de substâncias fenólicas, destaca-se o café, com comprovados benefícios à saúde, devido a várias atividades biológicas, como antioxidante, anticarcinogênica e antimicrobiana (GEORGE et al., 2008). Os grãos de café verde possuem maiores concentrações de ácidos clorogênicos (ACGs), quando comparados aos grãos torrados, pois durante o processo de torração essas substâncias são parcialmente degradadas (DUARTE et al. 2005). Além dessas atividades descritas, são realizadas pesquisas visando o desenvolvimento de produtos alimentícios empregando os grãos de café devido à sua atividade prebiótica (DZIKI et al., 2015; DONMEZ; MOGOL; GOKMEN, 2017; ZAIN; BABA; SHORI, 2018).

O consumo de alimentos funcionais tem aumentado em popularidade e, certamente, parece ser mais do que apenas uma tendência (ABDEL-HAMID et al., 2019). Diante disso, verifica-se a necessidade do setor de laticínios em aumentar a produção de derivados do leite com propriedades bioativas, diversificando as formas de consumo do produto (MEDEIROS et al., 2011).

A utilização do café verde em matrizes lácteas apresenta resultados ainda incipientes, requerendo o desenvolvimento de novos trabalhos a fim de otimizar a sua aplicabilidade, principalmente avaliando a interação com os constituintes e com as bactérias lácticas.

A interação entre substâncias fenólicas e bactérias ácido lácticas ainda não está bem elucidada. Algumas substâncias fenólicas podem estimular a taxa de multiplicação de bactérias lácticas e outras podem ter efeito bactericida. Além disso, as bactérias lácticas podem promover a biotransformação das substâncias fenólicas por meio de enzimas específicas, resultando em um aumento ou uma redução da atividade antioxidante.

Diante do exposto, o presente estudo avaliou a interferência da utilização do extrato de café verde em leites fermentados nas características físico-químicas, bioativas e microbiológicas do produto.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS

O leite possui um elevado valor biológico na alimentação humana, principalmente nos primeiros anos de vida, sendo, desta forma, considerado um alimento completo. Apesar de o leite ser caracterizado como um produto homogêneo, a caseína, que é considerada a proteína majoritária, apresenta-se na forma de suspensão coloidal, juntamente com a emulsão formada pela gordura, enquanto os minerais e algumas proteínas estão dissolvidas no soro aquoso (CRUZ et al., 2016).

Na glândula mamária das fêmeas dos animais mamíferos ocorre a produção do leite. É relevante conhecer os processos de síntese do leite para entender a composição do produto e suas variações, bem como as particularidades dos produtos lácteos fabricados na indústria de laticínios e os princípios de transformação do leite e derivados (CRUZ et al., 2016).

As propriedades sensoriais e tecnológicas do leite podem ser alteradas pela sua composição. Pode ocorrer uma grande variação nos teores de alguns componentes como gordura e proteína, enquanto a lactose e os minerais variam em menor proporção (VARGAS et al., 2002; MONTANHINI; MORAES; NETO, 2013).

A composição do leite pode ser alterada por fatores que agem diretamente sobre a síntese e a secreção do componente ou agem sobre o componente já secretado, no interior da glândula mamária. Os fatores mais importantes que afetam a composição do leite são a idade do animal, a genética, o estágio de lactação, o ambiente, o manejo de ordenha, a sanidade e a nutrição do animal (RIBEIRO et al., 2009; CABRAL et al., 2016).

O leite é um dos produtos mais versáteis da indústria de alimentos. Além de ser consumido na forma original, também pode ser transformado em derivados, como manteiga, queijos, iogurte, leite condensado, leite fermentado, doce de leite, dentre outros. Dessa forma, sua aplicação é constante e diversificada na indústria de alimentos, bem como na culinária doméstica e industrial (SIQUEIRA, 2018).

Os derivados lácteos apresentam uma grande importância nutricional, uma vez que apresentam altos teores em proteínas e exibem em sua composição minerais e vitaminas. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a

Alimentação e a Agricultura (FAO), não há uma recomendação mundial para o consumo de leite e derivados, de modo que cada país desenvolve suas próprias diretrizes alimentares levando em consideração variáveis como a disponibilidade de alimentos, os custos dos produtos alimentícios, o estado nutricional e os padrões de consumo da população (CRUZ et al., 2016; ZACARCHENCO; VAN DENDER; REGO, 2017).

Os produtos lácteos constituem o mais importante segmento dos alimentos funcionais (ABDEL-HAMID et al., 2019). O conceito de alimentos funcionais foi introduzido no Japão, por volta dos anos 1980, referindo-se aos alimentos que demonstravam benefícios fisiológicos, devido à presença de alguma substância existente nos mesmos. Naquela época, uma das primeiras definições de alimentos funcionais foi proposta pela *Foods for Specified Health Use* (FOSHU), descrevendo-os como alimentos que têm efeito específico sobre a saúde devido à sua constituição química, e que não devem oferecer risco à saúde de quem os consome (SANTOS et al., 2011; COSTA et al., 2013).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde. Com isso, estabelece as diretrizes para sua utilização, bem como as condições de registro para os alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde. A alegação de propriedade funcional engloba o papel metabólico ou fisiológico que o composto tem no crescimento, desenvolvimento e manutenção do organismo humano, enquanto a de saúde inclui a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

É crescente o interesse dos consumidores por produtos lácteos em decorrência de suas propriedades benéficas à saúde, como, por exemplo, a atividade probiótica e prebiótica. O leite é a matriz que mais se destaca ao ser empregada para obtenção de produtos com probióticos. Além disso, os consumidores de leite fermentado associam que consumir esse produto é uma forma de manter a saúde digestiva, além de exercer efeitos benéficos em desequilíbrios gastrointestinais (ZACARCHENCO; VAN DENDER; REGO, 2017).



### 2.1.1 Leite fermentado

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

Os leites fermentados apresentam um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos, especialmente por estarem associados à saúde, o que vem sendo de grande interesse da indústria láctea. O desenvolvimento de novos produtos no setor lácteo apresenta algumas vantagens, tais como, as propriedades tecnológicas da matriz láctea que permitem a viabilidade funcional de ingredientes adicionados ao produto, a elevada praticidade dos derivados lácteos e a relação que os consumidores fazem dos produtos lácteos com o aspecto de saudabilidade (COSTA et al., 2013).

Além disso, são os produtos de escolha pela indústria alimentícia para a adição de culturas probióticas e substâncias prebióticas (SANCHEZ et al., 2009). Dos leites fermentados acrescidos de probióticos e prebióticos, o iogurte é o mais popular, sendo elaborado a partir da fermentação realizada pelas bactérias *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, podendo ser acrescido ou não de outras bactérias ácido lácticas (BRASIL, 2007; COSTA et al., 2013).

## 2.2 EMPREGO DE EXTRATOS VEGETAIS EM PRODUTOS LÁCTEOS

Nos últimos anos, o crescente interesse do consumidor em adotar uma dieta saudável e a busca por produtos alimentícios diversificados levou à expansão do mercado de alimentos funcionais. A indústria alimentícia tem interesse em fabricar produtos alimentícios com melhores valores nutricionais e que tragam benefícios para a promoção da saúde (FENG et al., 2019).

O desenvolvimento de novos produtos utilizando extratos vegetais, considerados seguros, do ponto de vista toxicológico, se torna desejável pelas indústrias de alimentos (HELAL; TAGLIAZUCCHI, 2018).

Dentre os extratos obtidos a partir de vegetais, o extrato de café verde é uma das fontes mais importantes de polifenóis, em especial de ácidos clorogênicos (BABOVA; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2016). Devido ao seu alto poder antioxidante, os polifenóis são considerados um dos compostos naturais mais relevantes a serem utilizados como conservantes e ingredientes bioativos em alimentos (CALEJA et al., 2016).

Os alimentos antioxidantes exercem um papel importante na saúde humana, pois são responsáveis pela neutralização e desativação de radicais livres (NIERO et al., 2019).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Esse não-emparelhamento de elétrons da última camada é que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BERNAUD; FUNCHAL, 2011). Eles são formados devido à ação catalítica de enzimas que ocorrem *in vivo*, pela exposição a fatores exógenos ou durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

As reações metabólicas, principalmente as que envolvem oxigênio, produzem radicais livres com a capacidade de danificar outras moléculas por meio da oxidação. Em condições normais, o sistema antioxidante tem a capacidade de neutralizar a produção de radicais livres. Contudo uma produção exacerbada ou defeitos na capacidade antioxidante resultam em estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo e os radicais livres causam estresse citológico, especialmente associado à peroxidação lipídica, clivagem do DNA e alteração oxidativa de proteínas. Esse dano, em nível bioquímico, tem associação com diversas doenças como câncer, aterosclerose, artrite reumatoide, neurodegeneração e diabetes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A relação entre estresse oxidativo e doença de *Alzheimer* sugere que o estresse oxidativo é uma parte essencial do processo patológico, e antioxidantes podem ser favoráveis para o tratamento da doença (CHEN; ZHONG, 2014).

Os antioxidantes são substâncias que podem retardar ou prevenir a oxidação. O excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) no corpo humano pode ser removido por meio dos antioxidantes e, com isso, reduzir o risco de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (CHAN et al., 2018).

Dentre os produtos alimentícios, os iogurtes e outros leites fermentados são muito versáteis, uma vez que podem ser produzidos de forma simples ou adicionados de outros ingredientes. Essa versatilidade proporciona o desenvolvimento de diferentes tipos de produtos, tais como como iogurte grego, desnatado, agitado, probiótico, prebiótico e simbiótico. Neste sentido, o uso de preparações acrescidas de extratos de plantas pode aumentar as substâncias bioativas e atividade antioxidante dos leites fermentados (GRANATO et al., 2018).

Os leites fermentados podem ser elaborados com ingredientes que apresentam atividades biológicas, uma vez que a incorporação de diferentes frutas ou extratos vegetais, que contêm maiores concentrações de polifenóis, quando adicionados em leites fermentados ganha percepção positiva do consumidor. As substâncias presentes no extrato vegetal podem interagir tanto com os constituintes do leite quanto com as bactérias lácticas utilizadas no processo fermentativo. Essas interações podem propiciar efeitos benéficos ou não no produto final (JAZIRI et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2009; WATERHOUSE; ZHOU; WADHWA, 2012; LEJKO; SADY, 2015; GRANATO et al., 2018; MOGHADDAM et al., 2018; YU et al., 2018; NI et al., 2018; CHOUCHOULI et al., 2013; LIU; LV, 2019).

Além de propiciar atividade bioativa aos produtos, os antioxidantes presentes em vegetais são excelentes aditivos naturais e podem ser empregados também como alternativa aos sintéticos. O consumo excessivo de aditivos alimentares sintéticos está relacionado a reações adversas gastrointestinais, respiratórias, dermatológicas e neurológicas (CALEJA et al., 2016).

### 2.3 CAFÉ VERDE

Nos últimos anos, houve um grande interesse na utilização de grãos de café verde como aditivo alimentar natural para o desenvolvimento de produtos alimentícios, visto que eles são uma importante fonte de substâncias bioativas principalmente de ácidos clorogênicos (ACGs) (BUDRYN; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016; DESAI et al., 2020; SWIECA et al., 2018).

Os grãos de café verde são obtidos após as etapas de pós-colheita dos frutos do café e não são submetidos ao processo de torração. Durante o processo de torração ocorrem várias reações químicas responsáveis pelas características sensoriais da bebida do café. Nesse processo, os ácidos clorogênicos são

parcialmente degradados, o que promove menores teores de ACGs aos grãos torrados quando comparados aos grãos verdes (PEREIRA et al., 2019).

Devido à sua composição química, o café verde pode ser empregado como ingrediente funcional, pois aumenta as propriedades bioativas de produtos alimentícios (BUDRYN et al., 2013; DZIKI et al., 2015; SWIECA et al., 2018; ZAIN; BABA; SHORI, 2018).

Existem duas espécies principais de café com valor comercial, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta). O café arábica apresenta qualidades superiores de sabor e aroma se comparados ao robusta. No entanto o café robusta apresenta maiores teores de ácidos clorogênicos. As propriedades sensoriais do café determinam o seu valor de mercado (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; CASAS et al., 2017; PEREIRA et al., 2019).

### **2.3.1 Composição química dos grãos de café verde**

A composição química dos grãos de café verde não depende apenas da espécie e do cultivo, mas também dos métodos de colheita, que podem ser manuais ou mecânicos, processamento pós-colheita e armazenamento (CASAS et al., 2017).

Os compostos fenólicos são os metabólitos mais abundantes nas plantas e apresentam propriedade antioxidante. Os ACGs representam os principais componentes da fração fenólica e são considerados os mais importantes nos grãos de café verde. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se às suas propriedades redutoras e estrutura química. Essas características desempenham um papel relevante na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo na propagação do processo oxidativo (ABRAHÃO et al., 2010).

Os ácidos clorogênicos, encontrados principalmente no café verde, são polifenóis dietéticos importantes e biologicamente ativos. Os ACGs são ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (BAUER et al., 2018; PALMIERI et al., 2018). Eles representam um grupo de metabólitos secundários fenólicos produzidos por algumas espécies de plantas e um componente importante do café (*Coffea* spp.) (LALLEMAND et al., 2012; BADMOS; LEE; KUHNERT, 2019). Muitos efeitos benéficos do café podem ser atribuídos aos ácidos clorogênicos, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico o mais

abundante (BABOVA; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2016; REGAZZONI et al., 2016; VASUDEVAIAH et al., 2017; SWIECA et al., 2018;).

A Figura 1 apresenta o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ) e os seus isômeros ácido 3-O-cafeoilquínico (3-ACQ) e ácido 4-O-cafeoilquínico (4-ACQ) (CROZIER et al., 2011; NARITA; INOUYE, 2015).

Figura 1 – Estrutura química dos ácidos cafeoilquínicos



Fonte: Adaptado de (CROZIER et al., 2011).

Além dos ácidos clorogênicos, diversos compostos bioativos estão presentes no grão de café, tais como trigonelina, cafeína, tocoferóis e diterpenos (BAUER et al., 2018).

A cafeína é uma metilxantina classificada como pseudoalcaloide, que pode atingir cerca de 1,45% e 2,38% em *Coffea arabica* L. e em *Coffea canephora* Pierre, respectivamente, sendo o primeiro componente do café estudado pelas suas propriedades neuroprotetoras, antioxidante e antibiótica (BABOVA; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2016; PAN et al., 2016; CIARAMELLI et al., 2018).

Os carboidratos são os principais constituintes do grão de café verde. Os carboidratos solúveis apresentam um teor de 6% a 12,5% e os insolúveis, celulose e hemicelulose, apresentam um teor de 41%-43% e 5%-10%, respectivamente (DURÁN et al., 2017).

A fração lipídica dos grãos de café verde é composta principalmente por triacilgliceróis, além de esteróis e tocoferóis. Adicionalmente, o óleo de café apresenta uma fração insaponificável que contém cafestol e caveol, dois diterpenos de interesse devido às suas propriedades bioativas. Cafestol e caveol estão presentes na forma livre e esterificada com diferentes ácidos graxos (DURÁN et al., 2017).

A composição mineral dos grãos está relacionada à constituição do solo, altitude, umidade e temperatura durante a formação dos frutos do café. Em geral, o potássio aparece em quantidades elevadas seguidas de fósforo, magnésio e cálcio (PEREIRA et al., 2019; SAMSONOWICZ et al., 2019).

Dentre os ácidos voláteis encontrados no café estão o ácido acético, propanoico, isovalérico, hexanoico, decanoico e dentre os ácidos alifáticos não voláteis estão os ácidos cítrico, málico e quínico (DURÁN et al., 2017).

O processo de torração tem um impacto significativo sobre os compostos voláteis do café uma vez que o tempo e a temperatura afetam a composição do aroma do café torrado e a capacidade de extração de cada substância (CAPORASO et al., 2018).

Os ácidos clorogênicos, presentes nos grãos de café, sofrem alterações durante o processo de torração. Nesse processo, ocorre a decomposição e a formação de novas substâncias, alterando a capacidade antioxidante dos grãos (PRIFTIS et al., 2018; BURILLO et al., 2019). A torração pode contribuir com uma perda do conteúdo de ACGs, comprometendo seus benefícios (GETACHEW; CHUN, 2016; DESAI et al., 2020).

Sendo assim, o consumo de produtos com café verde tem aumentado nos últimos anos, uma vez que eles possuem maior concentração de ácidos clorogênicos, que trazem benefícios à saúde, quando comparados ao café torrado (SARRIÁ et al., 2016).

Os extratos de café verde são utilizados para enriquecimento de produtos alimentares com o intuito de prevenir mudanças oxidativas nos alimentos, adicionar propriedades bioativas e promover efeito benéfico à saúde humana (BUDRYN et al., 2013; DZIKI et al., 2015; BUDRYN; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016; SWIECA et al., 2018; ZAIN; BABA; SHORI, 2018).

## 2.4 BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BALs) são caracterizadas como Gram positivas, anaeróbias facultativas, catalase negativas e não esporuladas e apresentam como principal produto de fermentação o ácido láctico. Produzem um vasto número de enzimas lipolíticas, glicolíticas e proteolíticas, que convertem os nutrientes

fundamentais dos alimentos em substâncias com propriedades desejáveis (MOTTA; GOMES, 2015; BJORKROTH; KOORT, 2016; YERLIKAYA, 2019).

São pertencentes à ordem *Eubacteriales*, famílias *Streptococcaceae* e *Lactobacillaceae*. Os gêneros que compõem as bactérias ácido lácticas são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Tetragonococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus* e *Pediococcus* (BJORKROTH; KOORT, 2016; YERLIKAYA, 2019).

Nas fermentações de leite e de queijos, as BALs são os principais microrganismos que fornecem as mudanças sensoriais desejadas, além de aumentar o prazo de validade e a inocuidade do produto. Muitos *Lactobacillus* e *Lactococcus spp.* desempenham um papel importante nas fermentações de alimentos tradicionais e em uma gama crescente de novos alimentos e produtos projetados para ter benefícios nutricionais ou outros benefícios específicos para a saúde (BJORKROTH; KOORT, 2016).

As propriedades desejadas nos alimentos serão determinadas pela composição do leite e pela estabilidade da atividade proteolítica, lipolítica e autolítica das bactérias lácticas. É importante considerar que diferentes espécies têm diferentes padrões de comportamento e atividades em condições industriais (MOTTA; GOMES, 2015). As BALs são relevantes na garantia da proteção e segurança dos produtos lácteos por meio da produção de ácido láctico, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas que funcionam como agentes antimicrobianos (YERLIKAYA, 2019).

As condições de fermentação, temperatura de armazenamento, métodos de preservação, bem como as características inerentes de cada espécie podem afetar a viabilidade desses microrganismos nos alimentos. Isso é fundamental para que as culturas desempenhem suas funções e são importantes para determinar as propriedades dos alimentos (MOTTA; GOMES, 2015).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo (ABDOLLAHZADEH et al., 2018; BRASIL, 2018). Além disso, outro critério para que um produto seja considerado probiótico é a sobrevivência dos microrganismos probióticos pela passagem no trato gastrointestinal (YERLIKAYA, 2019). Uma distinção deve ser feita entre culturas probióticas e culturas iniciadoras. Para serem consideradas culturas probióticas é essencial que sejam comprovados os seus

benefícios à saúde, enquanto para cultura iniciadora é necessário confirmar sua capacidade de fermentar alimentos. Desta forma, nem toda cultura iniciadora é probiótica, sendo assim, nem todo alimento fermentado deve ser considerado probiótico (COSTA et al., 2013).

Algumas bactérias ácido lácticas são consideradas microrganismos probióticos devido aos seus efeitos benéficos, incluindo a melhora das disfunções gastrointestinais, aumento da imunidade, prevenção do câncer, redução dos níveis de colesterol no sangue, dentre outros (ABDOLLAHZADEH et al., 2018; JEONG et al., 2018; YERLIKAYA, 2019). *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium*, são constantemente usadas como bactérias probióticas (CHAN et al., 2018; YERLIKAYA, 2019).

O grupo de *Lactobacillus* composto pelos *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, são algumas das espécies probióticas mais amplamente pesquisadas e aplicadas no mercado de produtos fermentados. As bactérias com benefícios relacionados à saúde tiveram associação com efeito benéfico à saúde humana, quando houve consumo diário de produtos lácteos fermentados (HILL et al., 2018).

A capacidade de várias dessas cepas em contribuir na manutenção de uma microbiota saudável pode ser uma terapia auxiliar não invasiva para uma série de distúrbios. Eles poderiam ser implantados profilaticamente ou terapêuticamente no controle de várias doenças relacionadas a distúrbios na microbiota intestinal. Os mecanismos pelos quais essas bactérias, direta ou indiretamente, apresentam um efeito benéfico à saúde humana ainda não são totalmente compreendidos e requerem mais estudos. Potenciais mecanismos incluem a produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, aprimorando a barreira epitelial por meio da fixação, competição por locais de ligação com patógenos ou modulação do sistema imunológico (HILL et al., 2018).

O probiótico *Lactobacillus casei* LAFTI L26 é capaz de sobreviver e ser retido no trato digestivo de camundongos por pelo menos 48 horas, após a administração oral (SU; HENRIKSSON; MITCHELL, 2007). A viabilidade e a atividade de uma bactéria probiótica nos alimentos e no hospedeiro são considerações importantes, pois essas bactérias devem sobreviver nos alimentos durante sua vida útil e também no trato gastrointestinal. Desta forma, se este probiótico fosse administrado diariamente, uma população considerável de *Lactobacillus casei* LAFTI L26 viável



provavelmente seria retida no intestino (SU; HENRIKSSON; MITCHELL, 2007). Devido às suas propriedades benéficas, há um grande potencial de desenvolvimento de novos alimentos funcionais e farmacêuticos com adição de *Lactobacillus casei* (HILL et al., 2018).

Quando são adicionados de bactérias produtoras de ácido láctico, os leites fermentados apresentam uma grande notoriedade por parte do consumidor associados a potenciais benefícios à saúde e nutrição, tais como a melhoria da digestão da lactose, a inibição de infecções intestinais e o controle dos níveis séricos de colesterol (YU et al., 2018).

A interação entre substâncias fenólicas e bactérias ácido lácticas ainda não está bem elucidada. Algumas substâncias fenólicas podem estimular a taxa de multiplicação de bactérias lácticas e outras podem ter efeito bactericida em dois níveis diferentes da estrutura celular, parede celular e membrana citoplasmática. Essas alterações possivelmente levaram ao rompimento do envelope celular (RODRIGUEZ et al., 2009). Além disso, as bactérias lácticas podem promover a biotransformação das substâncias fenólicas por meio de enzimas específicas, resultando em um aumento ou redução da atividade antioxidante (KAPRASOB et al., 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de extrato de café verde na viabilidade microbiana e nas propriedades do leite fermentado probiótico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato aquoso de café verde seguido de secagem por atomização.
- Determinar a atividade antioxidante do extrato de café verde pelo método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e pelo método sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.
- Caracterizar o extrato de café verde por meio de análise espectroscópica no infravermelho médio com transformada de *Fourier* (FTIR-MIR).
- Produzir um leite fermentado utilizando extrato de café verde como ingrediente e realizar análises físico-químicas e microbiológicas do produto após a fermentação e durante o armazenamento a 4°C.
- Determinar a atividade antioxidante do leite fermentado pelo método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e pelo sistema  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico.
- Caracterizar o leite fermentado por meio da análise espectroscópica no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR-MIR); análise colorimétrica e determinação da sinérese.
- Avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* nos leites fermentados, após a fermentação e durante o armazenamento a 4°C.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Para a elaboração do leite fermentado foi utilizado leite integral ultrapasteurizado, extrato de grãos de café verde e cultura probiótica liofilizada LAFTI-L26 (DSM Food Specialties®), contendo *Lactobacillus casei*. Para a obtenção do extrato foram utilizados grãos de café beneficiados (*Coffea arabica* L.), adquiridos da Cooperativa dos Cafeicultores das Matas de Minas, Viçosa, Minas Gerais. Os grãos de café verde foram moídos em moinho de facas micro (MSSL-030) e tamisados (granulação de 840 µm /malha nº 20).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo do extrato de café verde

Adicionou-se 10g dos grãos de café verde moídos e tamisados (granulação de 840 µm /malha nº 20), em 100 mL de água destilada. A extração foi realizada por agitação em agitador orbital *shaker* (Cienlab®), durante 2 horas, 200 rpm a 25 °C (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2016).

Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado utilizando bomba de vácuo por meio de funil de *Büchner* e vidraria de *kitassato*, utilizando papel de filtro, tipo millex 14 µm.

O extrato bruto obtido, após o processo de extração, foi submetido ao processo de secagem utilizando-se o secador por atomização mini *spray dryer* modelo B-290 marca Büchi. Os parâmetros de secagem foram fixados em 160°C de temperatura do ar de entrada e 80°C a 82°C de temperatura do ar de saída. A vazão do ar de secagem foi de 40 L/min a 50 L/min e a vazão do produto foi de 25 L/min a 36 L/min (TORRES et al., 2016; NEVES et al., 2019). Após a secagem, o extrato foi armazenado em tubos Falcon hermeticamente fechado e mantido em dessecador.

## 4.2.2 Caracterização do extrato de café verde

### 4.2.2.1 Atividade antioxidante do extrato de café verde

- Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde frente ao radical DPPH foi realizada segundo o método adaptado de Blois (1958). A amostra foi adicionada em placa de 96 poços nas concentrações de 250 a 0,49 µg/mL (diluições sucessivas). Para isso, foram transferidos para um poço da placa 100 µL de uma solução 1 mg/mL em metanol (Biotec®) e foram realizadas 10 diluições sucessivas 1:2 em metanol. Posteriormente foram adicionados 150 µL de solução de DPPH (20 µg/mL) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em metanol.

Para o preparo do branco foram utilizados todos os reagentes, exceto a amostra, a qual foi substituída por metanol. A Quercetina (Dinâmica®) foi utilizada como substância de referência. A placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e em sequência a absorbância em espectrofotômetro UV/visível foi determinada a 517 nm.

- Determinação da atividade antioxidante pelo método sistema β caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante pelo método do descoramento do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada segundo Marco (1968) com modificações. Para o preparo da emulsão, foram utilizados 30 µL de ácido linoleico, 265 µL de Tween 40, 100 µL de solução de β-caroteno em diclorometano (10 µg/mL) e 500µL de diclorometano. A mistura foi submetida a nitrogênio gasoso por 50 minutos a fim de obter a completa evaporação do diclorometano. Foram adicionados 40 mL de água destilada previamente oxigenada (30 minutos), com o propósito de se obter uma solução emulsionada com densidade óptica na faixa de 0,6-0,7 nm. O extrato foi solubilizado em metanol na concentração de 222 µg/mL. 20 µL do extrato foram transferidos para microplaca de 96 poços e a cada amostra foram adicionados 250 µL da emulsão. A absorbância das amostras e do controle (sem adição de

antioxidante) foi medida a 470 nm ao longo de 2 horas a 45°C. Foram efetuadas 9 leituras, com 15 minutos de intervalo entre cada uma delas. A atividade antioxidante foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{CI} - A_{CF})(A_{AI} - A_{AF})}{(A_{CI} - A_{CF})} \times 100$$

Onde  $A_{CI}$  e  $A_{AI}$  representam a absorbância inicial do controle e da amostra respectivamente. E  $A_{CF}$  e  $A_{AF}$  são as absorbâncias finais do controle e da amostra respectivamente.

#### 4.2.2.2 Análise espectroscópica no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR-MIR)

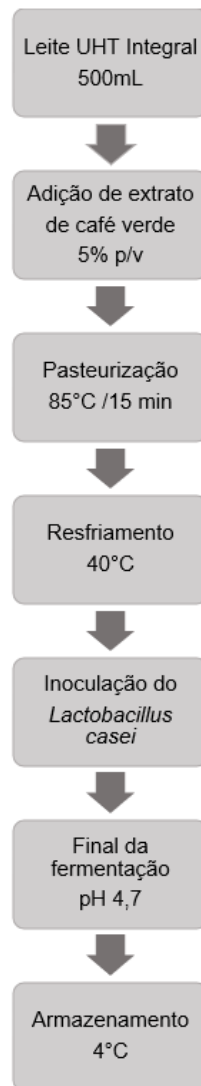
As análises por espectroscopia na região do infravermelho médio das micropartículas do extrato de grãos de café verde foram realizadas no modo de transmitância, utilizando o espectrômetro FTIR-MIR, modelo Vertex 70, com acessório para Reflectância Total Atenuada (ATR), (Bruker®) com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro foi obtido pelo Software (OPUS®) 6,5 nos números de ondas compreendidos na faixa de 900-3500  $\text{cm}^{-1}$ , com 64 leituras (scans). Os números de onda de 400-800  $\text{cm}^{-1}$  foram retirados por não conterem informações relevantes para análise do espectrômetro FTIR-MIR. Essa análise também foi realizada com o extrato de grãos de café verde como controle, segundo MOROS et al., 2006.

#### 4.2.3 Produção do leite fermentado

O leite fermentado foi preparado de acordo com o método ilustrado na Figura 2. Na preparação com extrato foram adicionados 5% p/v de extrato de café verde (BUDRYN et al., 2013; DONMEZ; MOGOL; GOKMEN, 2017). As preparações foram pasteurizadas por 15 minutos a 85°C, seguidas de resfriamento a 40°C, inoculadas com 0,25 mL de *Lactobacillus casei* ( $10^{12}$  UFC/mL) (LAFTI-L26 - DSM®), conforme recomendação do fabricante e incubadas a 37°C até pH 4,7. Posteriormente, as

amostras foram armazenadas a 4°C por 21 dias (ABDOLLAHZADEH et al., 2018). O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 2- Fluxograma do processo de elaboração do leite fermentado com extrato de café verde



Fonte: Elaborado pela própria autora

#### 4.2.4 Análises físico-químicas e microbiológicas

##### 4.2.4.1 Composição Centesimal

Para a obtenção da composição centesimal do leite fermentado com adição de extrato de café verde (LF-CE) e do leite fermentado sem adição de extrato de

café verde (LF-SE) foram realizadas as seguintes análises, em triplicata, de acordo com os seguintes métodos:

✓ Teor de umidade: foi determinado pelo método de secagem em estufa à 105°C (AOAC, 1997).

✓ Proteínas: o teor de proteínas dos leites fermentados foram determinados através de método automatizado, utilizando o aparelho *Sprint Protein Analyser* (CEM Corporation®). A dosagem de proteínas foi realizada a partir de 2 gramas de amostra seguindo as recomendações do fabricante.

✓ Gordura: a análise foi determinada pelo método de Gerber (IAL, 2008).

#### 4.2.4.2 Análises Microbiológicas

As determinações de coliformes totais a 35 °C e coliformes termotolerantes a 45 °C foram efetuadas pelo método do número mais provável (NMP) como descrito na 4ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA 2001): Como teste presuntivo, uma alíquota de 1mL das amostras foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Oxoid®), e os tubos foram incubados em estufa à temperatura de 35 ± 1 °C, por 24-48 horas. As amostras que apresentaram multiplicação microbiana e produção de gás foram transferidas para tubos com 9 mL de caldo Verde Bile Brilhante (VBB) (Oxoid®) 2% para confirmação, e incubadas a temperatura de 35 ± 1 °C, por 24-48 horas. A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada pela transferência de uma alçada, dos tubos considerados positivos no meio VBB, inoculadas em tubos com 5 mL de caldo EC-mug (Himedia®) incubados em estufa por até 24 ± 2 horas à 44 ± 1 °C.

Os bolores e leveduras foram enumerados pela inoculação de 1mL em profundidade (método *pour-plate*) ajustado com 3,5 ± 0,1 através da adição de solução de ácido tartárico com incubação em estufa por 3 a 5 dias a 25 ± 1 °C (SILVA et al., 2007).

#### 4.2.5 Avaliação da viabilidade das bactérias lácticas

Para contagem do *Lactobacillus casei* tanto no LF-CE quanto nas amostras de LF-SE foi utilizado o método de contagem em superfície empregando microgotas, conforme descrito em SILVA et al. (2007). Em fluxo laminar, o envelope contendo a cultura probiótica liofilizada de *Lactobacillus casei* (LAFTI-L26 - DSM®) foi solubilizado em 1L de leite desnatado estéril. De acordo com o fabricante a quantidade total de células viáveis no envelope é de  $10^{12}$  UFC/mL. Foram então aliquoteados em porções de 5 mL, transferidos para tubos estéreis (Falcon) e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Segundo a recomendação do fabricante, foram empregados 0,25 mL dessa alíquota em 500 mL de leite UHT integral para fermentação. Após a fermentação, 1 mL de cada amostra proveniente dos tempos 1, 7, 14 e 21 dias foram transferidas para tubos contendo 9mL de água peptonada 0,1% seguido de sucessivas diluições até  $10^{-8}$ . Em placas de Petri contendo meio MRS Ágar (Merck®), foram efetuados 3 inóculos em superfície, pelo método de *drop plate* (10  $\mu\text{L}$ ) das amostras provenientes das diluições:  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ .

Em seguida, foram incubados em microaerofilia a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

#### 4.2.6 Atividade antioxidante do leite fermentado

##### 4.2.6.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante do LF-CE e do LF-SE liofilizados nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias, frente ao radical DPPH foi realizada de acordo com Blois (1958) com modificações, conforme descrito no item 4.2.2.1.

##### 4.2.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante do LF-CE e do LF-SE liofilizados após a fermentação e durante o armazenamento, pelo método do descoramento do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizada segundo Marco (1968) com modificações, conforme descrito no item 4.2.2.1.



#### **4.2.7 Análise espectroscópica no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR-MIR)**

As análises por espectroscopia na região do infravermelho médio das amostras de LF-CE e LF-SE durante o período de armazenamento foram realizadas no modo de transmitância, utilizando o espectrômetro FTIR-MIR, modelo Vertex 70, com acessório ATR, (Bruker®) com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 4.2.2.2.

#### **4.2.8 Análise colorimétrica**

Para a obtenção do perfil colorimétrico dos LF-CE e LF-SE, foi utilizado o colorímetro da marca (Chroma Meter®), com leitura direta da reflectância das coordenadas L\*, a\*, b\* e cálculo h\* e C\*. Foram realizadas três medições de cada parâmetro colorimétrico com homogeneização em cada uma das amostras de leite fermentado durante o período de armazenamento (STANGERLIN et al., 2013).

#### **4.2.9 Análise de sinérese**

A sinérese das amostras de leite fermentado foi medida de acordo com a metodologia proposta por Tamime et al. (1996). O método foi baseado no movimento espontâneo de saída de soro do gel pela força de gravidade. A quantidade de soro expelido de 50g da amostra de leite fermentado armazenada durante 7 dias a 10°C foi expressa como mL de soro drenado.

#### **4.2.10 Análises estatísticas**

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando programa de estatística GraphPad Prism® (versão 6.0). Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido do teste t de Student (p<0,05). Os dados espectrais de absorção obtidos no FTIR-MIR foram realizados por meio de análise de componentes principais (ACP) utilizando o software MINITAB 16.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE

#### 5.1.1 Atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde

Os resultados da atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde estão demonstrados na Tabela 1. Corrigir o que está em amarelo

Tabela 1 – Atividade antioxidante do extrato de café verde pelos métodos DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

	Extrato de grãos de café verde	Quercetina
Atividade antioxidante CE <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) frente ao radical DPPH	7,75 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	0,48 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
% de inibição da co-oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	25,69 $\pm$ 6,17 <sup>a</sup>	89,89 $\pm$ 2,25 <sup>b</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média. Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). CE<sub>50</sub> (Concentração do extrato necessária para inibir metade da formação do radical livre).

Fonte: elaborado pela própria autora

Vários métodos têm sido utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro*. Dentre esses métodos, destacam-se o sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e o método de sequestro de radicais livres, como DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

O método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Esse método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação. Já o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta

quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Esse último, baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE- ALMEIDA et al., 2006).

Os resultados mostraram que o extrato de café verde apresentou atividade antioxidante  $CE_{50}$  frente ao radical DPPH de 7,75  $\mu\text{g/mL}$ . Quanto menor o  $CE_{50}$ , menor a concentração antioxidante, menor a concentração de antioxidante necessária para inibir 50% do radical DPPH (DUARTE- ALMEIDA et al., 2006).

Kiattisin; Nantarat; Leelapornpisid (2016) relataram ter encontrado um  $CE_{50}$  de 5,00 ( $\mu\text{g/mL}$ ) em um extrato de grãos de café verde obtidos por maceração estática em etanol. O solvente e as condições empregadas no processo são determinantes para a otimização da extração. As soluções hidroalcoólicas e os álcoois (principalmente metanol e etanol) são os solventes mais indicados para otimização da extração de ácidos clorogênicos (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2016). No entanto, para a escolha do solvente empregado deve-se considerar também os produtos nos quais os extratos serão empregados.

O extrato de café verde apresentou % de inibição da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico de 25,69%. Os resultados encontrados foram inferiores ao padrão utilizado, quercetina, mas bastante considerável, uma vez que a extração ocorreu em água. Os ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos clorogênicos, por estarem na forma esterificada na natureza possuem maior solubilidade lipídica do que na forma livre. Com isso, várias dessas substâncias estão sendo utilizadas como antioxidantes para preservar sistemas lipofílicos. Compreender a propriedade antioxidante do extrato de grãos de café verde em meio lipofílico, permite entender seus mecanismos de captação de radicais livres de uma forma mais abrangente e completa (RAZZAGHI- ASL et al., 2013).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE FERMENTADO

Os resultados da análise físico-química do leite fermentado, com e sem adição de extrato de café verde, estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Análises físico-químicas do leite fermentado com e sem adição de extrato de café verde

Análises	LF-CE	LF-SE
Umidade (%)	87,81 ± 1,27 <sup>a</sup>	88,77 ± 0,95 <sup>a</sup>
Proteína (g)	3,23 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,52 ± 0,04 <sup>b</sup>
Gordura (g)	3,03 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,04 <sup>a</sup>

Os valores correspondem à média ± erro padrão da média. Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste T- Student. LF-CE (Leite Fermentado com extrato de café verde); LF-SE (Leite Fermentado sem extrato de café verde).

Valores médios das análises físico-químicas realizadas no leite fermentado com e sem adição de extrato de café verde.

Fonte: elaborado pela própria autora

De acordo com a Instrução Normativa 46 do MAPA (BRASIL, 2007), não há recomendações mínimas de umidade para produtos lácteos fermentados, como é o caso do leite fermentado. No presente estudo, observa-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o LF-CE e o LF-SE com relação a esse parâmetro.

Os resultados do teor de proteínas encontrados nos LF-CE e no LF-SE estão de acordo com a legislação brasileira em vigor uma vez que esta permite que leites fermentados apresentem um conteúdo mínimo estabelecido de 2,9 g (g/100g) (BRASIL, 2007).

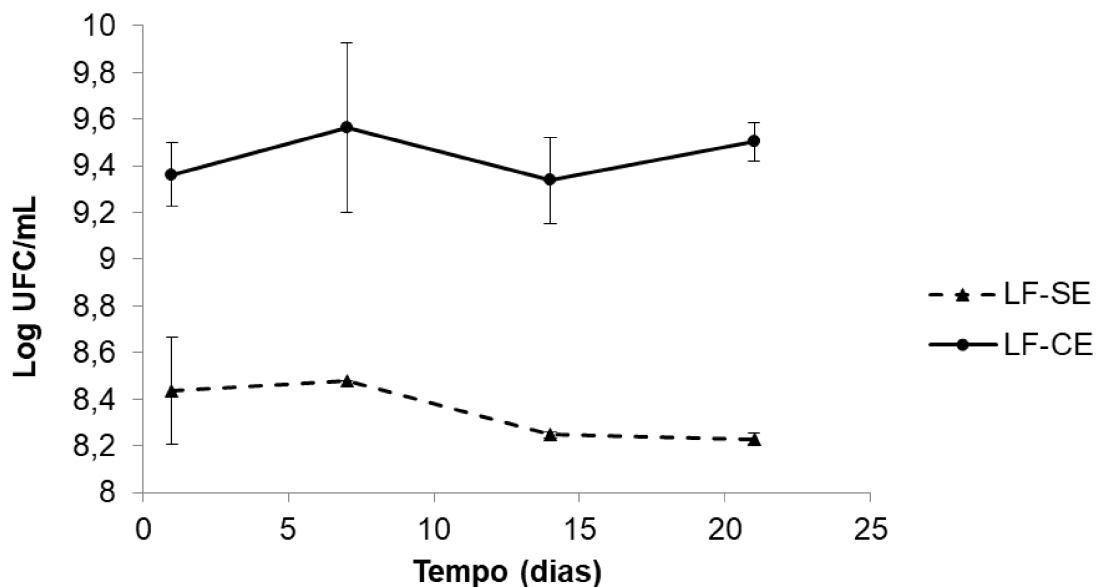
Um produto para ser considerado integral deve possuir matéria gorda mínima de 3,0 (g/100g) (BRASIL, 2007), desta forma os leites fermentados elaborados neste trabalho apresentaram valores de gordura conforme requerido pela legislação e não apontam diferenças significativas entre eles.

Quanto ao aspecto de inocuidade dos leites fermentados produzidos, ambos atenderam os padrões microbiológicos recomendados pela legislação brasileira (BRASIL, 2003), para bolores e leveduras ( $< 10$  UFC/mL), Coliformes a 35°C ( $< 0,3$  NMP/mL) e Coliformes a 45°C ( $< 0,3$  NMP/mL). Desta forma, é possível inferir que, os produtos foram elaborados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.

### 5.3 VIABILIDADE DA CULTURA PROBIÓTICA

Os resultados demonstraram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes amostras de leite fermentado. A contagem de *Lactobacillus casei* no LF-CE foi maior do que no LF-SE durante os 21 dias de armazenamento ( $10^9$  UFC/mL e  $10^8$  UFC/mL), respectivamente. A partir desses resultados notou-se que no LF-CE o número de células viáveis no produto durante todo o período de armazenamento se manteve o mesmo, bem como para o LF-SE (Figura 3).

Figura 3 – Contagem do *Lactobacillus casei* LAFTI- L26 durante o armazenamento do LF-CE e no LF-SE



Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão. LF-CE (Leite Fermentado com extrato de café verde), LF-SE (Leite Fermentado sem extrato de café verde).

Fonte: elaborado pela própria autora

A RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018 dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, para isso o microrganismo deve sobreviver às condições do trato digestório humano.

De acordo com a legislação para leite fermentado, este deve apresentar até o final da vida de prateleira no mínimo  $10^6$  UFC/g (BRASIL 2007). Desta forma, os

resultados obtidos atendem a legislação em vigor e tem potencial como alimento funcional.

Em relação a maior multiplicação do *Lactobacillus casei* no leite fermentado com adição de extrato de café verde, o resultado do presente estudo foi semelhante ao relatado por Mahmoud Abdel-Hamid et al. (2020), que encontraram uma melhora significativa na viabilidade de *L. casei* no iogurte de búfala com adição de extrato aquoso de *Siraitia grosvenorii* em comparação com o iogurte probiótico controle. Esse extrato contém fibras solúveis, monossacarídeos, aminoácidos essenciais e flavonóides, que podem fornecer um efeito prebiótico para o *L. casei*.

Os constituintes presentes nos grãos de café verde podem ter sido utilizados como substrato para a multiplicação do *L. casei*, uma vez que apresentam em sua composição carboidratos solúveis e insolúveis, como a celulose e hemicelulose; diversos compostos nitrogenados não proteicos tais como a cafeína; ácidos voláteis e não voláteis; minerais como potássio, cálcio e magnésio além da fração lipídica composta principalmente por triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis (DURÁN et al., 2017).

O extrato de *Echium amoenum* foi empregado como matéria prima para a produção de suco fermentado por quatro linhagens de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus delbrueckii*). Nesse estudo *in vivo*, todas as cepas bacterianas empregadas metabolizaram a glicose como a primeira fonte de carbono seguida de frutose e sacarose. A glicose é uma fonte superior de carbono e energia para *Lactobacillus* e *bifidobactérias* (JAHANDIDEH; MOUSAVI; RAZAVI, 2012).

Os oligossacarídeos extraídos do café verde podem ser utilizados como fonte de carbono para o cultivo de três cepas de *Lactobacillus*, devido à eficiência prebiótica, estimulando a multiplicação de *Lactobacillus casei in vitro* (DESAI et al., 2020).

Outras espécies vegetais também podem apresentar ação prebiótica contribuindo para a multiplicação de bactérias lácticas. A interferência do extrato de *Moringa oleífera* na multiplicação de bactérias ácido lácticas como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*, foi avaliada durante a fermentação de iogurte. O aumento da multiplicação das BALs pode ser atribuído aos componentes do extrato de *Moringa*, como os polifenóis. Os dados sugerem que o extrato de

*Moringa* tem efeitos prebióticos, promovendo a multiplicação das BALs durante a fermentação do iogurte (ZHANG et al., 2019).

De forma similar, um estudo avaliou os efeitos da adição de extrato de chá verde nas concentrações de 1%, 2% e 3%, na multiplicação de BALs durante a fermentação do iogurte. Os resultados mostraram que os iogurtes suplementados com extrato de chá verde apresentaram contagens de BALs superiores às do iogurte controle. Foi relatado que os compostos fenólicos promoveram a multiplicação das bactérias probióticas. Além disso, a adição de extrato de chá verde nos iogurtes manteve os níveis de *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium* durante 21 dias de armazenamento a frio (JEONG et al., 2018).

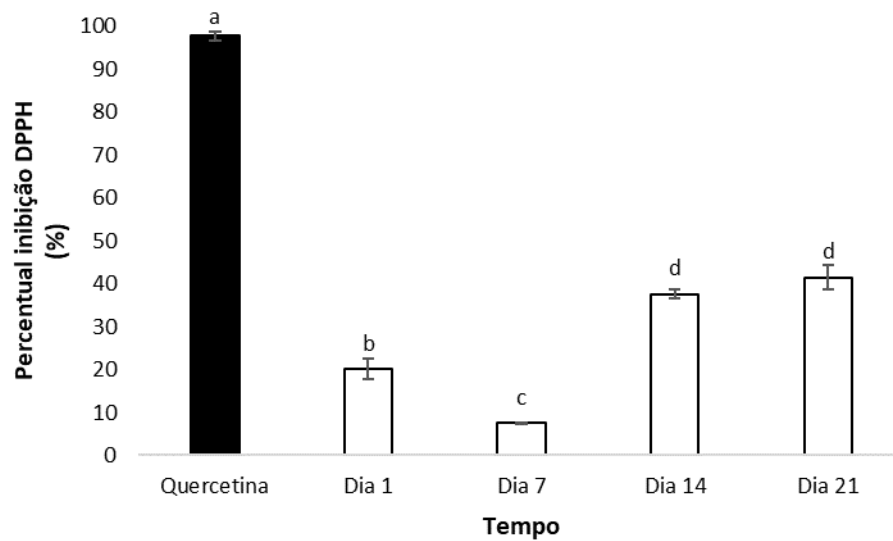
Os resultados do presente estudo foram relevantes tendo em vista que houve um aumento da atividade antioxidante das amostras de leite fermentado com adição de extrato de café verde sem prejudicar a viabilidade do *Lactobacillus casei*. Além disso, a adição de extrato de café verde nas amostras favoreceu a multiplicação da bactéria, demonstrando que foi possível aumentar a atividade biológica e contribuir para a viabilidade da cultura láctea no produto fermentado.

## 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO LEITE FERMENTADO

### 5.4.1 Determinação da atividade antioxidante pelo Método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Os resultados da atividade antioxidante do leite fermentado sem extrato de café verde foram acompanhados durante 21 dias de armazenamento a 4°C e estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Atividade antioxidante pelo método DPPH do leite fermentado sem extrato de café verde ao longo da vida de prateleira



Médias de tratamentos seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: elaborado pela própria autora

A atividade antioxidante da amostra de LF-SE apresentou um comportamento heterogêneo durante os diferentes dias de armazenamento. O percentual de inibição foi maior nos dias 14 (37,63%) e 21 (41,50%) quando comparados aos dias 1 (20,16%) e 7 (7,55%).

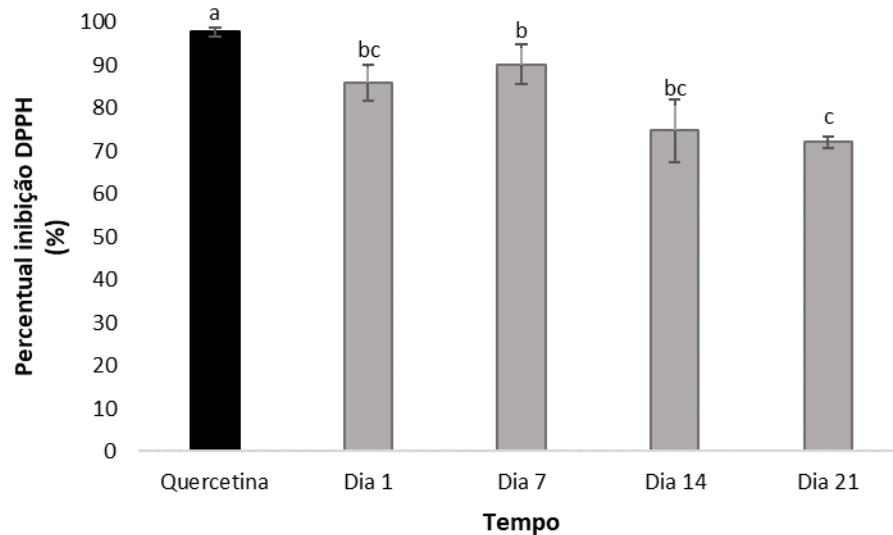
O leite contém vários fatores antioxidantes, como peptídeos bioativos derivados das proteínas da caseína e do soro de leite, lactoferrina, urato, coenzima Q10, vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno e sistemas enzimáticos (CHEN et al., 2003; PIHLANTO, 2006; LEJKO et al., 2014).

Além disso, foi observado que alguns *Lactobacillus* podem produzir substâncias com atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o risco de acumulação de EROs durante a ingestão de alimentos (KULLISAAR et al., 2002). Alguns peptídeos antioxidantes foram identificados em produtos lácteos fermentados. No leite fermentado com *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foi descrito um peptídeo derivado de k-caseína com atividade de eliminação de radicais DPPH (PIHLANTO et al., 2006).



A atividade antioxidante do leite fermentado com extrato de café verde foi acompanhada durante 21 dias de armazenamento a 4°C e os resultados estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Atividade antioxidante pelo método DPPH do leite fermentado com extrato de café verde ao longo da vida de prateleira



Médias de tratamentos seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: elaborado pela própria autora

A atividade antioxidante do LF-CE nos dias 1, 7, 14 e 21 apresentou valores de 85,89%, 90,24%, 74,82% e 72,13% respectivamente, indicando que a amostra apresentou atividade antioxidante favorável. No primeiro, sétimo e décimo quarto dia, o percentual de inibição da amostra não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), essa diferença foi demonstrada entre o dia 7 com o último dia de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

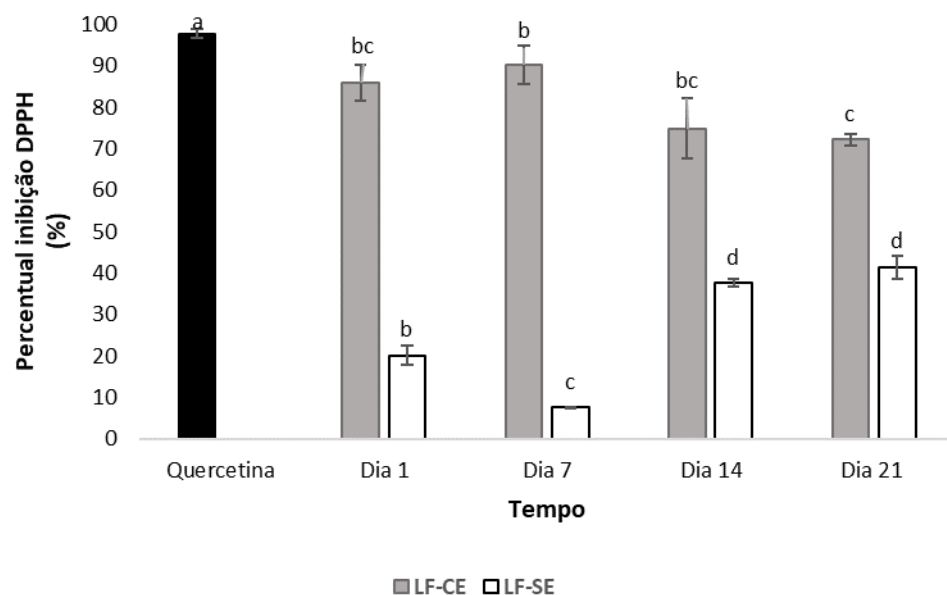
A atividade antioxidante do leite fermentado com adição de extrato de café verde é resultado da modificação da matriz alimentícia bem como do metabolismo do *Lactobacillus casei* que utiliza esse substrato. As principais substâncias responsáveis pela capacidade antioxidante do extrato de café verde são compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos, que são ésteres de ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico) com ácido quínico (VASUDEVAIAH et al., 2017; PALMIERI et al., 2018).

Os microrganismos podem modificar a composição química do extrato de café originando outras substâncias que podem aumentar ou diminuir a atividade antioxidante (PALMIERI et al., 2018).

A fermentação com *Lactobacillus casei* pode aumentar a atividade antioxidante, podendo ser útil na indústria de laticínios, a fim de fornecer uma fonte eficaz e segura de antioxidantes na dieta, beneficiando o consumidor (ZHANG et al., 2011).

O comparativo da atividade antioxidante do leite fermentado com e sem extrato de café verde foi acompanhada durante 21 dias de armazenamento a 4°C e os resultados estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Atividade antioxidante pelo método DPPH do leite fermentado com e sem extrato de café verde



Médias de tratamentos seguidas de mesma letra não diferem entre si para o mesmo tempo, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. LF-CE, Leite Fermentado com extrato de café verde; LF-SE, Leite Fermentado sem extrato de café verde.

Fonte: elaborado pela própria autora

Ao comparar o LF-CE e o LF-SE em relação ao percentual de inibição durante o período de armazenamento, observa-se que a adição de extrato de café verde contribuiu para o aumento da atividade antioxidante pelo método DPPH. A amostra

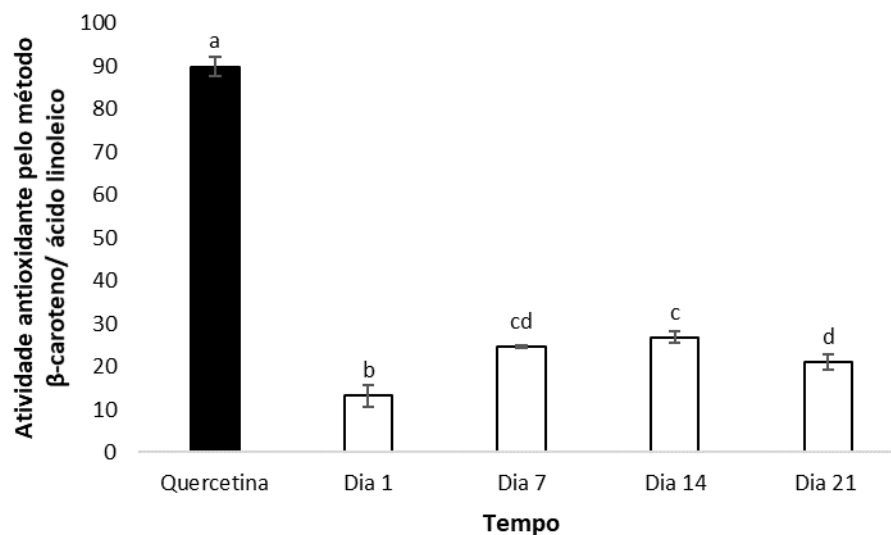
de LF-CE apresentou valores superiores quando comparada ao LF-SE em todos os tempos avaliados.

Diante do exposto, pode-se inferir que o LF-SE apresentou atividade antioxidante por apresentar diversos compostos presentes no leite, além daqueles oriundos do metabolismo do *Lactobacillus casei*. A atividade antioxidante potencializada no LF-CE se deve à incorporação do extrato de café verde na matriz alimentícia a ser fermentada pelo *Lactobacillus casei*.

#### 5.4.2 Determinação da atividade antioxidante pelo Método Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante do leite fermentado sem extrato de café verde foi acompanhada durante 21 dias de armazenamento e os resultados estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Atividade antioxidante expressa como percentual de inibição pelo método  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico do leite fermentado sem extrato de café verde ao longo da vida de prateleira



Médias de tratamentos seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

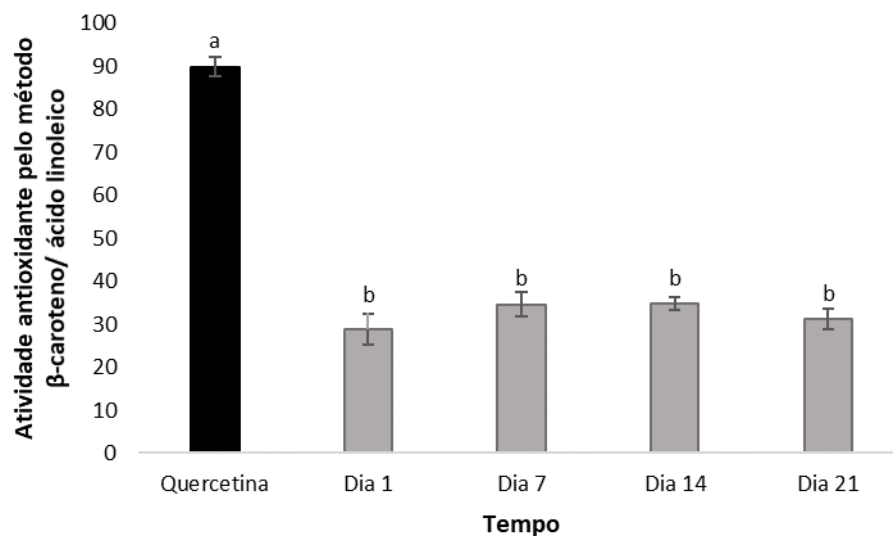
Fonte: elaborado pela própria autora

A amostra de leite fermentado apresentou valores de 13,23%, 24,62%, 26,81%, 21,07% referentes aos dias 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento, respectivamente.

Houve diferença significativa do 1º dia comparado ao dia 7, 14 e 21. Porém, o dia 7 e o dia 14, tanto quanto o dia 7 e o dia 21 foram significativamente iguais. Os dias 14 e 21 diferiram significativamente entre si.

A atividade antioxidante do leite fermentado com extrato de café verde foi acompanhada durante 21 dias de armazenamento e os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Atividade antioxidante expressa como percentual de inibição pelo método  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico do leite fermentado com extrato de café verde ao longo da vida de prateleira



Médias de tratamentos seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: elaborado pela própria autora

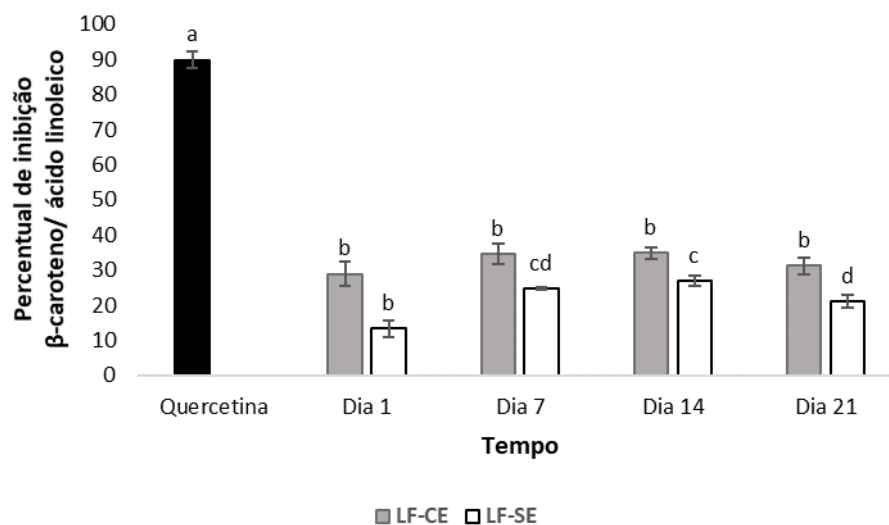
Observa-se que houve diferença significativa entre as amostras de LF-CE e a quercetina pelo método  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico. A atividade antioxidante da amostra foi de 28,87% no primeiro dia, 34,60% no sétimo dia, 34,78% no décimo quarto dia e 31,21% no vigésimo primeiro dia de armazenamento.

Os resultados revelaram que a amostra com extrato de café verde não retratou diferença significativa ao longo dos 21 dias de armazenamento.

O método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da oxidação do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; ALVES et al., 2010).

O comparativo da atividade antioxidante do leite fermentado com e sem extrato de café verde foi acompanhada durante 21 dias de armazenamento e os resultados estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Comparativo da atividade antioxidante expressa como percentual de inibição pelo método  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico do leite fermentado com e sem extrato de café verde



Médias de tratamentos seguidas de mesma letra não diferem entre si para o mesmo tempo, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. LF-CE, Leite Fermentado com extrato de café verde; LF-SE, Leite Fermentado sem extrato de café verde.

Fonte: elaborado pela própria autora

As amostras de LF-CE e LF-SE se comportaram de maneira diferente para o método  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico quando comparado ao método DPPH. O percentual de inibição foi menor nesse método, para as duas amostras.

As amostras de LF-CE seguiram um padrão linear de percentual de inibição, não apresentando diferença significativa durante os 21 dias de armazenamento. No

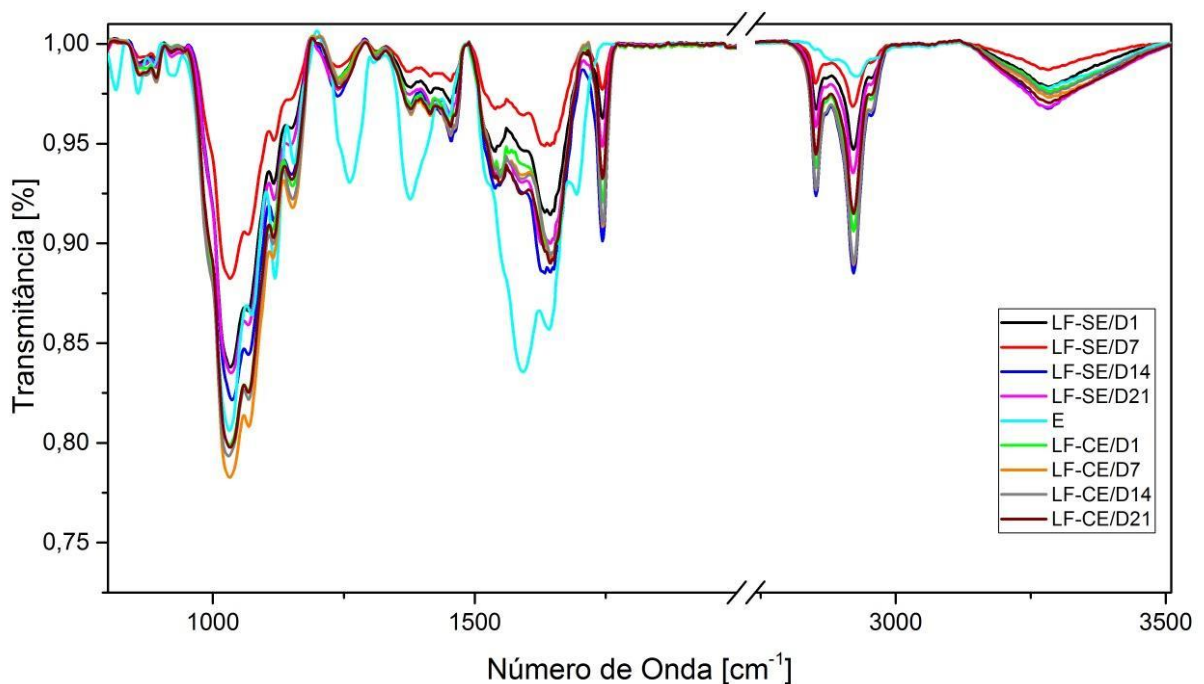
LF-SE há um aumento no percentual de inibição nos dias 7 e 14 com uma consequente redução do dia 14 para o dia 21.

A amostra de LF-CE apresentou um maior percentual de inibição pelo método  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico, quando comparada à amostra de LF-SE, a partir do dia 7 de armazenamento.

## 5.5 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-MIR)

A figura 10 apresenta os espectros de absorção das amostras de leite fermentado com e sem adição de extrato nos quatro dias de armazenamento (1,7, 14, 21), e do extrato puro de grãos de café verde. Os espectros mostram as principais bandas de absorção em aproximadamente 1000, 1250, 1400, 1600, 1650,1750, 2850, 2900, 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 10 - Espectros FTIR-MIR dos leites fermentados e do extrato de café verde



LF-CE (Leite Fermentado com extrato de café verde); LF-SE (Leite Fermentado sem extrato de café verde); E (Extrato de café verde puro). Primeiro dia de armazenamento (D1), Sétimo dia de armazenamento (D7), Décimo quarto dia de armazenamento (D14), Vigésimo primeiro dia de armazenamento (D21).

Fonte: elaborado pela própria autora

Todos os espectros apresentaram picos de absorção nas mesmas bandas, porém com diferentes intensidades e em alguns casos formatos de picos.

A região entre 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ , refere-se a diferentes tipos de vibrações C-H, C-O e  $\text{CH}_3$  que são características de carboidratos. O pico de intensidade mais alto tanto para o extrato de café verde, quanto para as amostras de leite fermentado é próximo a 1032  $\text{cm}^{-1}$  (VODNAR; POP; SOCACIU, 2012; PĂUCEA et al., 2017). A presença desta alta absorção neste número de onda era esperada, pois os carboidratos são os principais constituintes do grão de café verde (VASUDEVAIAH et al., 2017).

A lactose é o principal glicídio do leite. A quantidade de lactose pode variar em diferentes espécies, sendo que o leite de vaca apresenta em média 4,8% desse açúcar. A lactose é um dissacarídeo formado pela ligação glicosídica  $\beta(1,4)$  entre as moléculas de galactose e glicose (CRUZ et al., 2016).

Em aproximadamente 1250  $\text{cm}^{-1}$ , o extrato apresentou o pico de maior intensidade dentre as amostras, essa banda refere-se à deformação axial assimétrica da ligação C-O-C, a qual indica a presença de ésteres ou éteres (LINGEGOWDA et al., 2013; GHAFAROKHI et al., 2016). Possivelmente, houve esta alta absorção neste número de onda devido aos grãos de café serem fontes de substâncias fenólicas, como ácidos clorogênicos, que são encontradas sob a forma de ésteres na natureza (UPADHYAY; RAMALAKSHMI; RAO., 2012; MOREIRA, 2013; AFFONSO et al., 2016; DESAI et al., 2020).

A região localizada entre 1310 e 1790  $\text{cm}^{-1}$ , está relacionada ao estiramento C=O, C=C e N-H dos grupos amida (MOROS et al., 2006). Essa é uma região mista contendo bandas vibracionais de ácidos graxos, proteínas, polissacarídeos, substâncias aromáticas, dentre outras.

É possível identificar picos com diferentes intensidades e formatos tanto para o extrato quanto para as amostras de leite fermentado na região característica de carboidratos, atribuída à deformação assimétrica da ligação C-H  $\text{sp}^3$  alifática, em aproximadamente 1450  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda (GHAFAROKHI et al., 2016; PANWAR et al., 2016).

Em torno do número de onda de 1600  $\text{cm}^{-1}$ , os picos de absorbância correspondem à banda de estiramento da ligação C=C de substâncias aromáticas. Essas vibrações podem estar relacionadas ao alongamento do anel benzeno (SHAO et al., 2014). O extrato de café verde é uma importante fonte de algumas

substâncias aromáticas como as substâncias fenólicas que são um grupo extenso e heterogêneo, por isso o extrato é a amostra que tem o pico de maior intensidade nesta região.

As amostras de leite fermentado possuem picos com o ápice deslocados para  $1650\text{ cm}^{-1}$  de número de onda, diferentemente, do extrato de café verde. Essa região é atribuída a vibração de alongamento C=O de lipídeos (VODNAR; POP; SOCACIU, 2012). O pico de absorção em  $1750\text{ cm}^{-1}$  também é característico dos grupos funcionais dos ácidos carboxílicos e dos ésteres, oriundos principalmente dos lipídios e ácidos graxos (MOROS et al., 2006; VODNAR; POP; SOCACIU, 2012; PĂUCEA et al., 2017). A concentração de gordura no leite pode variar de 1% até 50% em diferentes raças. Os triacilgliceróis constituem 98% do total de lipídeos no leite, contendo ainda diacilglicerol, monoacilglicerol, fosfolipídios, ácidos graxos livres, cerebrosídeos, gangliosídeos, colesterol e ésteres de colesterol, carotenoides, vitamina A e vitamina E. Os triglicerídeos são compostos por uma grande variedade de ácidos graxos livres que diferem quanto ao tamanho da cadeia carbônica, dentre eles o ácido butírico, palmítico, oleico entre outros (CRUZ et al., 2016).

Em  $2500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  de número de onda, há picos referentes às vibrações dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  dos ácidos graxos presentes em amostras de leite fermentado, como descrito por Moros et al. (2006). Duas bandas distintas e específicas para bactérias probióticas são localizadas em torno de  $3000\text{ cm}^{-1}$  ( $\sim 2845$  e  $\sim 2929\text{ cm}^{-1}$ ), estas são características de ácidos graxos da parede celular bacteriana (MOROS et al., 2006; VODNAR; POP; SOCACIU, 2012). Nessa região o extrato de grãos de café verde possui baixa absorção.

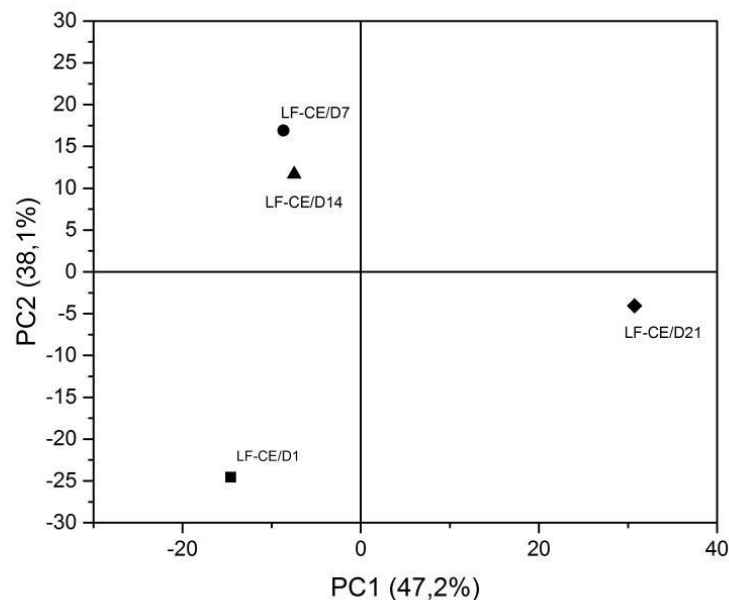
Ao analisar visualmente os espectros de absorção, não foi possível evidenciar as diferenças entre as amostras de leite fermentado com e sem adição de extrato em relação a presença e ausência de picos, apenas na intensidade deles, por isso foi realizada a análise de componentes principais (ACP) para melhor avaliar, por meios estatísticos, as diferenças entre os perfis espectrais.

Essa dificuldade na análise visual dos espectros pode estar relacionada aos constituintes de maior concentração do leite fermentado que possuem absorção nas mesmas bandas da região MIR, como é o caso das proteínas, lipídeos e açúcares, não evidenciando os picos relacionados a adição de extrato (VODNAR; POP; SOCACIU, 2012; PĂUCEA et al., 2017).



A Figura 11 mostra o gráfico de pontuação da ACP para o primeiro e o segundo componente principal (PC1 e PC2) aplicados aos espectros 400 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de leite fermentado com adição de extrato de café verde ao longo do armazenamento. Os primeiros PCs acumularam 85,3% da variação (PC1: 47,2%; PC2: 38,1%).

Figura 11 - ACP aplicada às amostras de leite fermentado com adição de extrato de café verde ao longo do armazenamento



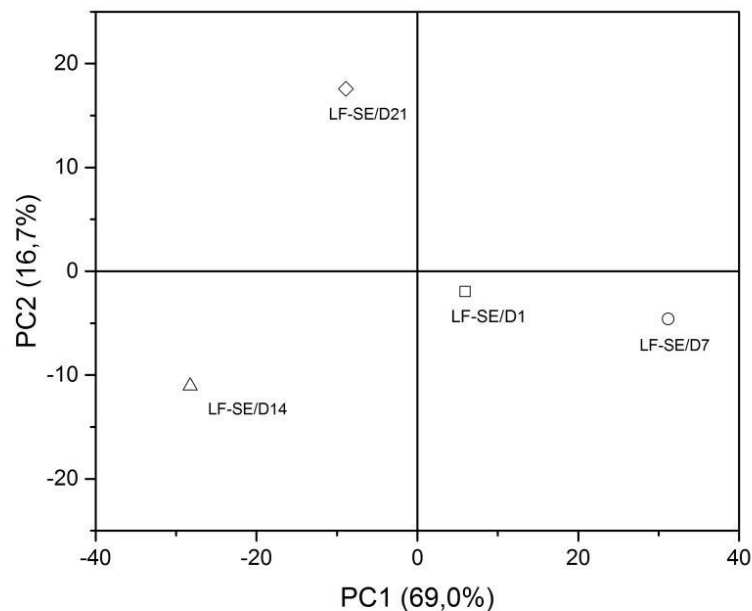
LF-CE, Leite Fermentado com extrato de café verde. Primeiro dia de armazenamento (D1), Sétimo dia de armazenamento (D7), Décimo quarto dia de armazenamento (D14), Vigésimo primeiro dia de armazenamento (D21).

Fonte: elaborado pela própria autora

As amostras de leite fermentado com adição de extrato de café verde nos dias 1, 7 e 14 de armazenamento se agruparam na região negativa de PC1, enquanto a amostra do dia 21 permaneceu na região positiva do PC1. Os leites fermentados dos dias 7 e 14 apresentaram semelhanças entre si, pois se agruparam na região de PC2 positiva. As amostras dos dias 1 e 21 foram as que mais se distanciaram demonstrando que houve alterações químicas ao longo do período de armazenamento.

A Figura 12 mostra o gráfico de ACP para o primeiro e o segundo componente principal (PC1 e PC2) aplicados aos espectros 400 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de leite fermentado sem adição de extrato de café verde ao longo do armazenamento. Os primeiros PCs acumularam 85,7% da variação (PC1: 69,0%; PC2: 16,7%)

Figura 12 - ACP aplicada às amostras de leite fermentado sem adição de extrato ao longo do armazenamento



LF-SE, Leite Fermentado sem extrato de café verde. Primeiro dia de armazenamento (D1), Sétimo dia de armazenamento (D7), Décimo quarto dia de armazenamento (D14), Vigésimo primeiro dia de armazenamento (D21).

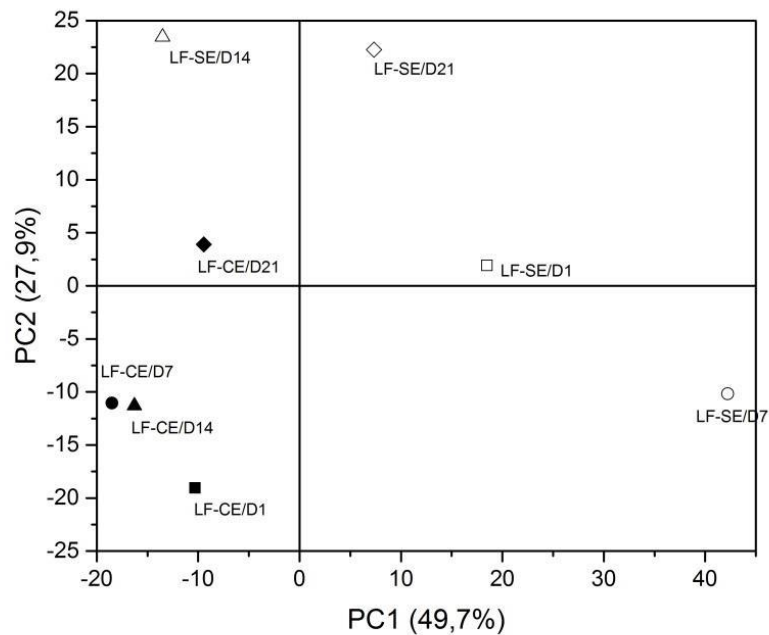
Fonte: elaborado pela própria autora

A análise de componentes principais demonstrou que as amostras de leite fermentado sem adição de extrato dos dias 1 e 7 de armazenamento se agruparam na região positiva de PC1, e as amostras dos dias 14 e 21 ficaram na região negativa do PC1. Enquanto no PC2, os leites fermentados dos dias 1, 7 e 14 se agruparam na região negativa e a amostra do dia 21 ficou na região positiva.

Os resultados da ACP demonstram que durante o armazenamento ocorreram modificações na constituição química do leite fermentado sem extrato, na qual houve menor diferença entre as amostras dos dias 1 e 7, seguidas da amostra do dia 14 que se diferenciou das duas amostras iniciais, e finalizando com a amostra do dia 21 que apresentou maior diferença em relação ao início do armazenamento.

A Figura 13 apresenta o gráfico de ACP para o primeiro e o segundo componente principal (PC1 e PC2) aplicados aos espectros 400 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de leite fermentado com e sem adição de extrato de café verde nos 4 tempos de armazenamento. Os primeiros PCs acumularam 77,6% da variação (PC1: 49,7%; PC2: 27,9%).

Figura 13 - ACP aplicada às amostras de leite fermentado com e sem adição de extrato de café verde



LF-CE, Leite Fermentado com extrato de café verde; LF-SE, Leite Fermentado sem extrato de café verde; Primeiro dia de armazenamento (D1), Sétimo dia de armazenamento (D7), Décimo quarto dia de armazenamento (D14), Vigésimo primeiro dia de armazenamento (D21).

Fonte: elaborado pela própria autora

Os leites fermentados com adição de extrato de café verde ao longo do armazenamento se agruparam na região negativa de PC1, enquanto as amostras de

leite fermentado sem extrato ficaram na região de PC1 positiva, menos a amostra do dia 14. As amostras LF-CE e LF-SE ficaram nitidamente separadas entre si.

Pela análise visual de comparação dos espectros entre os leites fermentados não foi possível visualizar muitas diferenças. No entanto, pela ACP foi comprovado que a concentração de extrato de café verde promoveu alterações na constituição química dos leites fermentados. Isso se deve, principalmente, pela incorporação de diferentes constituintes e modificações devido aos metabólitos gerados pela bactéria.

## 5.6 ANÁLISE COLORIMÉTRICA DOS LEITES FERMENTADOS

Os valores médios dos parâmetros de coloração das amostras de leite fermentado com e sem extrato de café verde estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios dos parâmetros de cor das amostras de LF-SE e LF-CE durante 21 dias de armazenamento

AMOSTRAS	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21
<b>L*</b>				
LF-SE	97,64 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	97,56 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	96,22 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	97,06 ± 0,25 <sup>Aa</sup>
LF-CE	88,22 ± 0,29 <sup>Ba</sup>	90,27 ± 0,20 <sup>Ba</sup>	89,92 ± 0,86 <sup>Ba</sup>	89,21 ± 0,87 <sup>Ba</sup>
<b>a*</b>				
LF-SE	- 2,54 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	- 2,66 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	- 2,77 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	- 3,06 ± 0,04 <sup>Aa</sup>
LF-CE	- 3,41 ± 0,57 <sup>Aa</sup>	- 3,21 ± 0,46 <sup>Aa</sup>	- 3,29 ± 0,56 <sup>Aa</sup>	- 3,26 ± 0,40 <sup>Aa</sup>
<b>b*</b>				
LF-SE	10,32 ± 0,34 <sup>Aa</sup>	9,10 ± 0,25 <sup>Aa</sup>	9,92 ± 0,41 <sup>Aa</sup>	9,45 ± 0,21 <sup>Aa</sup>
LF-CE	14,44 ± 0,81 <sup>Ba</sup>	12,29 ± 0,16 <sup>Bb</sup>	13,23 ± 0,94 <sup>Bab</sup>	13,59 ± 0,47 <sup>Bab</sup>
<b>h*</b>				
LF-SE	103,84 ± 0,34 <sup>Aa</sup>	106,29 ± 0,27 <sup>Aa</sup>	105,62 ± 0,31 <sup>Aa</sup>	107,97 ± 0,21 <sup>Bab</sup>
LF-CE	103,54 ± 1,88 <sup>Aa</sup>	104,65 ± 2,10 <sup>ABa</sup>	103,88 ± 1,51 <sup>Aba</sup>	103,62 ± 1,33 <sup>Aa</sup>
<b>C*</b>				
LF-SE	10,63 ± 0,35 <sup>Aa</sup>	9,48 ± 0,25 <sup>Aa</sup>	10,3 ± 0,41 <sup>Aa</sup>	9,94 ± 0,21 <sup>Aa</sup>

LF-CE	14,85 ± 0,90 <sup>Ba</sup>	12,70 ± 0,15 <sup>Bb</sup>	13,64 ± 1,04 <sup>Bab</sup>	13,98 ± 0,54 <sup>Bab</sup>
-------	----------------------------	----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Os valores correspondem às médias ± desvio padrão. Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna e letras minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). LF-CE (Leite Fermentado com extrato de café verde); LF-SE (Leite Fermentado sem extrato de café verde). H\* ângulo de tonalidade; C\* índice de saturação/ croma; L\* luminosidade; a\* Coordenada verde-vermelho; b\* Coordenada azul-amarelo.

Fonte: elaborado pela própria autora

Os parâmetros de cor avaliados foram, a coordenada L\* que representa o quanto clara ou escura é a amostra, com valores variando de 0 (totalmente preta) a 100 (totalmente branca); coordenada a\* (componente verde/vermelho), onde valores negativos e positivos indicam, respectivamente, cores verde e vermelha e a coordenada b\* (componente azul/amarelo), de modo que valores negativos indicam cor azul e valores positivos indicam cor amarela. A partir dos valores de a\* e b\*, foram calculados o croma (C\*) (pureza da cor ou saturação) e o ângulo hue (h\*) [indica a variação de cor no plano formado pelas coordenadas a\* e b\* variando entre o vermelho (0°), amarelo (90°) e verde (180°)], através das fórmulas:  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  e  $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$  (BICHO et al., 2012; MAMEDE et al., 2015; ZHANG et al., 2019).

Ao avaliar o LF-CE e LF-SE, após o término do processo fermentativo, houve diferença significativa para as coordenadas L\*, b\* e C\*. O LF-CE apresentou menor valor de luminosidade e maiores valores para a coordenada b\* e o índice de saturação (C\*).

O LF-SE não apresentou mudança de coloração ao longo do tempo para nenhuma das coordenadas avaliadas. Para as coordenadas L\* e a\* o LF-CE não apresentou alteração de coloração ao longo dos 21 dias de armazenamento, porém para a coordenada b\* observa-se que a amostra do dia 1 diferiu significativamente do dia 7 e não apresentou diferença com o dia 14 e dia 21. Já as amostras do dia 7, 14 e 21 não diferiram significativamente entre si.

Os resultados encontrados no presente estudo para o leite fermentado com adição de extrato estão de acordo com os achados de Najgebauer-Lejko et al. (2019) para dois parâmetros analisados (L\* e b\*). Eles encontraram baixa luminosidade (L\*) e valores mais altos para os componentes a\* e b\* no iogurte com adição de extrato de chá Pu-erh.

As alterações nos leites fermentados com extratos vegetais dependem das características de cada extrato e das concentrações empregadas, mantendo a

luminosidade igual ao leite fermentado sem extrato ou diminuindo seus valores. As demais coordenadas são variáveis em função do extrato vegetal empregado (ZHANG et al., 2019; LEJKO et al., 2014). Os resultados encontrados no presente estudo, não compromete a coloração do produto final.

## 5.7 ANÁLISE DE SINÉRESE

A amostra de leite fermentado com extrato de café verde apresentou 2,7 mL  $\pm$  0,9 de soro enquanto a amostra de leite fermentado sem extrato de café verde não apresentou sinérese.

As características físicas dos leites fermentados, como a sinérese, são importantes tendo em vista que podem limitar o prazo de validade e a aceitabilidade dos produtos pelos consumidores. Ela é considerada um dos parâmetros mais importantes que indicam a qualidade do leite fermentado durante o armazenamento (DONMEZ; MOGOL; GOKMEN, 2017).

Os estudos que utilizam extratos vegetais na elaboração de leites fermentados demonstram que a sinérese nesses casos é dose dependente e sugerem que concentrações maiores de polifenóis podem induzir a sinérese devido à não preservação do gel formado (NAJGEBAUER-LEJKO et al., 2014, JEONG et al., 2018). Além da concentração de extrato empregada, a espécie vegetal também interfere na sinérese devido aos diferentes perfis e concentrações de polifenóis (NAJGEBAUER-LEJKO et al., 2014; DONMEZ; MOGOL; GOKMEN, 2017).

De acordo com o modelo de interação proteína-polifenol proposto por Siebert et al. (1996) a estrutura molecular formada a partir da ligação dos compostos fenólicos aos sítios de ligação das proteínas, podem influenciar a liberação do soro presente no gel. Sendo assim a concentração e a constituição tanto das proteínas quanto das substâncias fenólicas podem propiciar um aumento ou diminuição da sinérese.

Dönmez et al. (2017) descreveu uma redução da sinérese em iogurte quando se empregou o extrato de café verde (*Coffea canephora* var. 'Robusta') a 2%, e nessa mesma concentração houve um aumento da sinérese quando utilizou-se o extrato de chá verde. No entanto, em concentrações menores do chá, houve uma redução da sinérese. Além da concentração de extrato utilizada, destaca-se também que quantidade de substâncias fenólicas por miligrama de extrato bem como o perfil

fenólico são variáveis importantes a serem avaliadas na determinação da sinérese. Comparados à espécie *Coffea arabica* L. os grãos de café robusta apresentam maior concentração de fenólicos (JESZKA-SKOWRON et al. 2016). Os extratos vegetais em pó empregados em leites fermentados podem ser obtidos por meio de secagem em *spray dryer*. Durante a secagem podem ser empregados agentes encapsulantes, como por exemplo o amido (GARCÍA-GURROLA et al., 2019). A utilização de outros ingredientes durante a secagem do extrato pode interferir na sinérese do leite fermentado. O amido é um dos agentes espessantes mais utilizados na indústria, podendo melhorar as características de determinados alimentos em relação à sinérese e à consistência (COSTA et al., 2013).

## 6 CONCLUSÃO

A adição de extrato de café verde em leite fermentado propiciou um aumento da atividade antioxidante do produto sem que houvesse a perda da viabilidade da bactéria láctica. Além de manter a viabilidade, a utilização do extrato permitiu uma maior multiplicação do *Lactobacillus casei*.

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados, com e sem extrato de café verde, estão de acordo com a legislação vigente. As análises de avaliação de cor e espectroscopia no infravermelho, demonstraram as diferenças físicas e químicas dos dois produtos.

O LF-CE apresentou baixa luminosidade e maiores valores para a coordenada  $b^*$  e o índice de saturação ( $C^*$ ), quando comparado ao LF-SE.

A análise feita pela ACP mostrou que a adição de extrato de café verde promoveu alterações na constituição química dos leites fermentados, principalmente pelas modificações devido aos metabólitos gerados pela bactéria.

A adição de extrato de café verde, nas condições utilizadas neste trabalho, promoveu maior sinérese. Desta forma, se faz necessário o ajuste da concentração de extrato a ser adicionado ou a adição de ingredientes permitidos pela legislação visando à redução da sinérese.

A utilização do extrato de café verde no desenvolvimento de leite fermentado empregando ingredientes naturais com propriedades bioativas mostrou-se promissora, apresentando um constituinte inovador e uma alternativa frente a outros ingredientes com características antioxidantes.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, M.; REMEIH, E.; GAMBA, R. R.; NAGAI, E.; SUZUKI, T.; KOYANAGI, T.; ENOMOTO, T. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. **International Dairy Journal**, n.91, p.1-8, 2019.

ABDEL-HAMID, M.; ROMEIH, E.; HUANG, Z.; ENOMOTO, T.; HUANG, L. Bioactive properties of probiotic set-yogurt supplemented with *Siraitia grosvenorii* fruit extract. **Food Chemistry**, p. 1-7, 2020.

ABDOLLAHZADEH, S. M.; ZAHEDANI, M. R.; RAHMDEL, S.; HEMMATI, F.; MAZLOOMI, S. M.; Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract. **Food Science and Technology**, v.98, p. 577–582, 2018.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*coffea arabica* L.). **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr., 2010.

AFFONSO, R. C. L.; VOYTENA, A. P. L.; FANAN, S.; PITZ, H.; COELHO, D. S.; HORSTMANN, A. L.; PEREIRA, A.; UARROTA, V. G.; HILLMANN, M. C.; VARELA, L. A. C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARASCHIN, M. Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. P. 1-10, 2016.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANVISA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de Propriedades Funcionais e/ou Saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Ministério da Saúde, Brasília, 1999.

ANVISA (2018). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução nº 241, de 26 de julho de 2018. **Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos**. Ministério da Saúde, Brasília.

AZEVEDO, V. M.; PEREIRA, C. G.; SANTOS, G.; CARNEIRO, J. D. S.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R. Informação nutricional e influência de atributos sensoriais na aceitação de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n.383, v.66, p.49-56, 2011.

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, n.123, p.33–39, 2016.

BADMOS, S.; LEE, S. H.; KUHNERT, N. Comparison and quantification of chlorogenic acids for differentiation of green Robusta and Arabica coffee beans. **Food Research International**, p. 1-17, 2019.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. V.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J.; Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 23, v.4, p.629-643, jul./ago, 2010.

BAUER, D.; ABREU, J.; JORDÃO, N.; ROSA, J. S.; SILVA, O. F.; TEODORO, A.; Effect of Roasting Levels and Drying Process of *Coffea canephora* on the Quality of Bioactive Compounds and Cytotoxicity. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, p. 1-19, 2018.

BERNAUD, F. S. R.; FUNCHAL, C.; Atividade antioxidante do açaí. **Nutrição Brasil**, v.10, n.5, 2011.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.; Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p. 123-130,1999.

BICHO, N. C.; LEITÃO, A. E.; RAMALHO, J. C.; LIDON, F. C. Use of colour parameters for roasted coffee assessment. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 436-442, jul/set, 2012.

BJORKROTH, J.; KOORT, J. Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. **Reference Module in Food Sciences**. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 ago, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, anexo à presente Instrução Normativa**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 out.2007. Seção 1, p. 5, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BURILLO, S. P.; MEHTA, T.; MUNOZ, A. E.; PASTORIZA, S.; PALIY, O.; HENARES, J. A. R. Effect of in vitro digestion-fermentation on green and roasted coffee bioactivity: The role of the gut microbiota. **Food Chemistry**, n.279, p.252–259, 2019.

BUDRYN, G.; ZACZYNSKA, D.; ORACZ, J. Effect of addition of green coffee extract and nanoencapsulated chlorogenic acids on aroma of different food products. **Food Science and Technology**, n. 73, p. 197-204, 2016.

BUDRYN, G.; ZYZELEWICZ, D.; NEBESNY, E.; ORACZ, J.; KRYSIAK, W. Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. **Food Research International**, n. 50, p.149–160, 2013.

CABRAL, J. F.; SILVA, M. A. P.; CARVALHO, T. S.; BRASIL, R. B.; GARCIA, J. C.; NASCIMENTO, L. E. C. Relação da composição química do leite com o nível de produção, estágio de lactação e ordem de parição de vacas mestiças. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, p. 244-255, 2016.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CAROCHO, M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERRERA, I. C. F. R. Fortification of yogurts with diferente antioxidante preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. **Food Chemistry**, n.210, p.262–268, 2016.

CAPORASO, N.; WHITWORTH, M. B.; CUI, C.; FISK, I. D. Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. **Food Research International**. v.108, p. 628–640, 2018.

CASAS, M. I.; VAUGHAN, M. J.; BONELLO, P.; GARDENER, B. M.; GROTEWOLD, E.; ALONSO, A. P. Identification of biochemical features of defective *Coffea arabica* L. beans. **Food Research International**, n.95, p.59–67, 2017.

CHAN, C. L.; GAN, R. Y.; SHAH, N. P.; CORKE, H. Enhancing antioxidant capacity of Lactobacillus acidophilus-fermented milk fortified with pomegranate peel extracts. **Food Bioscience**, v.26, p. 185–192, 2018.

CHEN J., LINDMARK-MÅNSSON H., GORTON L., ÅKESSON B., Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. **International Dairy Journal**, v. 13, 927-935, 2003.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull**, v.30, n.2, p.271-281, April, 2014.

CHOUCHOULI, V.; KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; KARVELA, E.; MAKRIS, D. P.; KARATHANOS, V. T. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Science and Technology**, n.53, p.522-529, 2013.

CIARAMELLI, C.; PALMIOLI, A.; LUIGI, A. D.; COLOMBO, L.; SALA, G.; RIVA, C.; ZOIA, C. P.; SALMONA, M.; AIROLDI, C. NMR-driven identification of anti-amyloidogenic compounds in green and roasted coffee extracts. **Food Chemistry**, n. 252, p.171–180, 2018.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B. P.; CRUZ, A. G.; JÚNIOR, C. A. C. Leitefermentado: potencialalimento funcional. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16; p. 1387-1397, 2013.

CROZIER, T. W. M.; STALMACH, A.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. **Food and Function**, 2011.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1- 2, 2016.

DAWIDOWICZ, A.L.; TYPEK, R. Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process. **European Food Research and Technology**, v. 243, n.3, p. 379-390, 2016.

DESAI, N. M.; MARTHA, G. S.; HAROHALLY, N. V.; MURTHY, P. S. Non-digestible oligosaccharides of green coffee spent and their prebiotic efficiency. **Food Science and Technology**, v. 118, p. 1-7, 2020.

DONMEZ, O.; MOGOL, B. A.; GOKMEN, V. Syneresis and rheological behaviors of set yogurt containing green tea and green coffee powders. **Journal of Dairy Science**, v.100, n. 2, p. 901-907, 2017.

DUARTE- ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr/jun, 2006.

DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; MENEZES, H. C.; SANTOS, M. H.; GOUVÊA, C. M. C. P. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 25, n. 2, p. 387-393, abr/jun, 2005.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 1, p.107-134, 2017.

DZIKI, D.; DZIKI, U. G.; PECIO, L.; RÓZYLO, R.; SWIECA, M.; KRZYKOWSKI, A.; RUDY, S. Ground green coffee beans as a functional food supplement e Preliminary study. **Food Science and Technology**, n.63, p.691-699, 2015.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, n.46, p. 488- 495, 2012.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, 2013.

FENG, C.; WANG, B.; ZHAO, A.; WEI, L.; SHAO, Y.; WANG, Y.; CAO, B.; ZHANG, F. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. **Food Chemistry**, v.277, p. 238–245, 2019.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, n.43, v.1, p.61-68, 1997.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E.C.; FERREIRA, N. C. A.; MENDONÇA, J. B.; NORBONA, R. A. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.386, p.45-54, 2012.

GARCIA- GURROLA, A.; RINCÓN, S.; ESOBAR-PUENTES, A.A.; ZEPEDA, A.; BUSTOS, F.M. Microencapsulation of Red Sorghum Phenolic Compounds with Esterified Sorghum Starch as Encapsulant Materials by Spray Drying. **Food Technol. Biotechnol.** v.57, n.3, p. 341-349, 2019.

GEORGE, S. E.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. A Perception on Health Benefits of Coffee. **Critical reviews in food science and nutrition.** v. 48, p. 464- 486, 2008.

GETACHEW, A.T.; CHUN, B.S. Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 38, p. 24–31, 2016.

GHAHFAROKHI, M.G., BARZEGAR, M., SAHARI, M.A.; AZIZI, M. H. Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 18, p. 1781-1792, 2016.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; SALEM, R. D. S.; MORTAZAVIAN, A. M.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G.; Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented, milks, and ice creams: a technological perspective. **Current Opinion in Food Science**, v.19, p.1-7, 2018.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in-vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. **Food Science and Technology**, v.89, p.164–170, 2018.

HILL, D.; SUGRUE, I.; TOBIN, C.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R. P. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-12, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ [2008]. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAHANDIDEH, F.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H. Utilization of *Echium amoenum* Extract as a Growth Medium for the Production of Organic Acids by Selected Lactic Acid Bacteria. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 2275–2279, 2012.

JAZIRI, I.; SLAMA, M. B.; MHADHBI, H.; URDACI, M. C.; HAMDY, M. Effect of green and black teas (*Camellia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. **Food Chemistry**, n.112, p.614–620, 2009.

JEONG, C. H.; RYU, H.; ZHANG, T.; LEE, C. H.; SEO, H. G.; HAN, S. G. Green tea powder supplementation enhances fermentation and antioxidant activity of set-type

yogurt. **Food Sci Biotechnol**, v.27, n.5, p. 1419–1427, 2018.

JESZKA-SKOWRON, M.; SENTKOWSKA, A.; PYRZYNSKA, K.; PAZ DE PEÑA, M. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. **Eur Food Res Technol**. Fev, 2016.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, n.59, p.141–149, 2017.

KIATTISIN, K.; NANTARAT, T.; LEELAPORNPID, P. Evaluation of antioxidant and anti-tyrosinase activities as well as stability of green and roasted coffee bean extracts from *Coffea arabica* and *Coffea canephora* grown in Thailand. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**. v.8, n.10, p. 182-192, 2016.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEM, T.; ANNUKB, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 215–224, 2002.

LALLEMAND, L. A.; ZUBIETA, C.; LEE, S. G.; WANG, Y.; ACAJJAOU, S.; TIMMINS, J.; MCSWEENEY, S.; JEZ, J. M.; MCCARTHY, J. G.; MCCARTHY, A. A. A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. **Plant Physiol**, v. 160, p. 249-260, 2012.

LEJKO, D. N. Characteristics of probiotic yoghurts supplemented with pu-erh tea infusion. **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment**, v. 18, n. 2, p. 153–161, 2019.

LEJKO, D. N.; SADY, M. Estimation of the antioxidant activity of the commercially available fermented milks. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria** V.14, n.4, p.387–396, 2015.

LEJKO, D. N.; ZMUDZINSKI, D.; PTASZEK, A.; SOCHA, R. Textural properties of yogurts with green tea and Pu-erh tea additive. **International Journal of Food Science and Technology**, n.49, p.1149–1158, 2014.

LINGEGOWDA, D. C., KUMAR, J.K., DEVIPRASAD, A.G., ZAREI, M., GOPAL, S. FTIR spectroscopic studies on *Cleome gynandra* – comparative analysis of functional group before and after extraction. **Romanian Journal of Biophysics**, v. 22, p. 137-143, 2013.

LIU, D.; LV, X. X. Effect of blue berry flower pulpon sensory, physico chemical properties, lactic acid bacteria, and antioxidant activity of set-type yogurt during refrigeration. **Journal of Food Processing and Preservation**, n.43, 2019.

MAMEDE, A. M. G.; PEREIRA, M. S. G.; SANTOS, T. F.; OLIVEIRA, T. C.; LIMA, I. S.; MORAIS, A. C. F.; SOUZA, A. M.; SILVA, O. F.; OLIVEIRA, E. M. M. Efeito dos níveis de torra na cor e no rendimento da extração de dna de cafés. *In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil* [Anais]. Curitiba, 2015.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594- 598, 1968.

MEDEIROS, E. J. L.; LIMA, A. R. C.; MOURA, M. D.; MOREIRA, R. T. Leite fermentado de marcas comerciais: estudo da aceitação e correlação com ph e acidez. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n.381, v. 66, p.46-51, 2011.

MOGHADDAM, A. D.; GARAVAND, F.; RAZAVI, S. H.; TALATAPPE, H. D. Production of saffron-based probiotic beverage by lactic acid bacteria. **Journal of Food Measurement and Characterization**, n.12, p.2708–2717, 2018.

MONTANHINI, M. T. M.; MORAES, D. H. M.; NETO, R. M. Influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 18-22, 2013.

MOREIRA, M. E. C. Avaliação do potencial farmacológico de café (*Coffea arabica L.*) verde e torrado. 2013. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

MOROS, J.; IÑÓN, F. A.; KHANMOHAMMADI, M.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Evaluation of the application of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectrometry (ATR–FTIR) and chemometrics to the determination of nutritional parameters of yogurt samples. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, p. 708–715, 2006.

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

NARITA, Y.; INOUE, K. Chlorogenic acids from coffee. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 189-199, 2015.

NEVES, M. I. L.; BANON, S. D.; PERRONE, I. T.; DESOBRY, S.; PETIT, J. Encapsulation of curcumin in milk powders by spray-drying: Physicochemistry, rehydration properties, and stability during storage. **Powder Technology**, v.345, p. 601–607, 2019.

NI, H.; HAYES, H. E.; STEAD, D.; RAIKOS, V. Incorporating salal berry (*Gaultheria shallon*) and blackcurrant (*Ribes nigrum*) pomace in yogurt for the development of a beverage with antidiabetic properties. **Heliyon**, p. 1-23, 2018.

NIERO, G.; PENASA, M.; COSTA, A.; CURRO, S.; VISENTIN, G.; CASSANDRO, M.; MARCHI, M. Total antioxidant activity of bovine milk: Phenotypic variation and predictive ability of mid-infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 89, p. 105-110, 2019.

PALMIERI, M. G. S.; CRUZ, L. T.; BERTGES, F. S.; HÚNGARO, H. M.; BATISTA, L. R.; SILVA, S. S.; FONSECA, M. J. V.; RODARTE, M. P.; VILELA, F. M. P.; AMARAL,

M. P. H. Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p.43–48, 2018.

PAN, M.; TUNG, Y.; YANG, G.; LIA, S.; HOE, C. Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. **Food & Function**, n. 7, p. 4481-4491, 2016.

PANWAR, R.; PEMMARAU, S.C., SHARMA, A. K., PRUTHI, V. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 21-31, 2016.

PĂUCEAN, A.; VODNAR, D.C.; MUREȘAN, V.; FETEA, F.; RANGA, F.; MAN, S. M.; MUSTE, S.; SOCACIU, C. Monitoring lactic acid concentrations by infrared spectroscopy: a new developed method for lactobacillus fermenting media with potential food applications. **Acta Alimentaria**, v. 46, n. 4, p. 420–427, 2017.

PEREIRA, G. V. M.; NETO, D. P. C.; JÚNIOR, A. I. M.; VÁSQUEZ, Z. S.; MEDEIROS, A. B. P. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, n.272, p.441–452, 2019.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v.16, p.1306-1314, 2006.

PRIFTIS, A.; PANAGIOTOU, E. M.; LAKIS, K.; PLIKA, C.; HALABALAKI, M.; NTASI, G.; VESKOUKIS, A. S.; STAGOS, D.; SKALTSOUNIS, L.A.; KOURETAS, D. Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. **Food and Chemical Toxicology**, v.114, p.119–127, 2018.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of StructureActivity Relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, p. 4436-4450, 2013.

REGAZZONI, L.; SALIGARI, F.; MARINELLO, C.; ROSSONI, G.; ALDINI, G.; CARINI, M.; ORIOLI, M. Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, n. 20, p. 472–485, 2016.

RIBEIRO, A. B.; TINOCO, A. F. F.; LIMA, G. F. C.; GUILHERMINO, M. M.; RANGEL, A. H. N. Produção e composição do leite de vacas gir e guzerá nas diferentes ordens de parto. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 46-51, 2009.

RODRIGUEZ, H.; CURIEL, J. A.; LANDETE, J. M.; RIVAS, B.; FELIPE, F. L.; CORDOVÉS, C. G.; MANCHEÑO, J. M.; MUÑOZ, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.79–90, 2009.



- SAMSONOWICZ, M.; REGULSKA, E.; KARPOWICZ, D.; LESNIEWSKA, B. Antioxidant properties of coffee substitutes rich in polyphenols and minerals. **Food Chemistry**, n.278, p.101–109, 2019.
- SANCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.L.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 1-10, 2009.
- SANTOS, F. F.; ALMEIDA, M. A.; BRUMANO, L. P.; PEREIRA, M. S.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, M. A. O. Elaboração do relatório técnico-científico para registro de leites fermentados com alegação de propriedade funcional. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n.383, v. 66, p.40-48, 2011.
- SARRIÁ, B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SIERRA-CINOS, J. L.; GARCÍA-DIZ, L.; MATEOS, R.; BRAVO-CLEMENTE, L. Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, 2016.
- SHAO, P.; ZHANG, J.; FANG, Z.; SUN, P. Complexing of chlorogenic acid with b-cyclodextrins: Inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice. **Food Hydrocolloids**, n. 41, p. 132-139, 2014.
- SIEBERT, K.J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P.Y. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. **J. Agric. Food Chem.** v.44, n.1, p. 80-85, 1996.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007.
- SIQUEIRA, K. B. Leite e derivados: tendências de consumo. **Anuário Leite**. Embrapa Gado de Leite, 2018.
- STANGERLIN, D. M.; COSTA, A. F.; GONÇALEZ, J. C.; PASTORE, T. C. M.; GARLE, A. Monitoramento da biodeterioração da madeira de três espécies amazônicas pela técnica da colorimetria. **Acta Amazônica**, n.4, v. 43, p. 429 – 438, 2013.
- SU, P.; HENRIKSSON, A.; MITCHELL, H. Survival and retention of the probiotic *Lactobacillus casei* LAFTIL26 in the gastrointestinal tract of the mouse. **Letters in Applied Microbiology**, n. 44, p. 120-125, 2007.
- SWIECA, M.; DZIKI, U. G.; SECZYK, L.; DZIKI, D.; SIKORA, M. Interactions of green coffee bean phenolics with wheat bread matrix in a model of simulated in vitro digestion. **Food Chemistry**, v.258, p. 301–307, 2018.
- TAMIME, A. Y.; BARRANTES, E.; SWORD, A. M. The effect of starch based fat substitutes on the microstructure of set-style yogurt made from reconstituted skimmed milk powder. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, February, 1996.

- TORRES, J. K. F.; STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; CARVALHO, A. F.; COSTA, R. G. B.; SCHUCK, P.; PERRONE, I. T. Hidrólise da lactose e produção de leite em pó: aspectos tecnológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 94-105, 2016.
- UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food Chemistry**, p. 184–188, 2012.
- VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; SANTOS, F. L.; QUEIROZ, A. C.; MANCIO, A. B. Adição de Lipídios na Ração de Vacas Leiteiras: Parâmetros Fermentativos Ruminais, Produção e Composição do Leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.522-529, 2002.
- VASUDEVAIAH, A. M.; CHATURVEDI, A.; KULATHOORAN, I. D. Effect of green coffee extract on rheological, physico-sensory and antioxidant properties of bread. **J Food Sci Technol**, n.54, v.7, p.1827–1836, 2017.
- VODNAR, D. C.; POP, O. L.; SOCACIU, C. Monitoring Lactic Acid Fermentation in Media Containing Dandelion (*Taraxacum officinale*) by FTIR Spectroscopy. **Not Bot Horti Agrobo**, v. 40, n. 1, p. 65-68, 2012.
- WATERHOUSE, D. S.; ZHOU, J.; WADHWA, S. S. Effects of Adding Apple Polyphenols Before and After Fermentation on the Properties of Drinking Yoghurt. **Food Bioprocess Technol**, n.5, p. 2674–2686, 2012.
- YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.1, p.124-134, 2019.
- YU, Y.; WU, J.; XU, Y.; XIAO, G.; ZOU, B. The effect of litchi juice on exopolysaccharide production in milk fermented by *Lactobacillus casei*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.53, p. 2730–2737, 2018.
- ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. **Brasil Dairy Trends 2020**. 1. Ed. – Campinas: ITAL, 2017.
- ZAIN, M. Z. M.; BABA, A. S.; SHORI, A. B. Effect of polyphenols enriched from green coffee bean on antioxidant activity and sensory evaluation of bread. **Journal of King Saud University – Science**, n.30, p.278–282, 2018.
- ZHANG, S.; LIU, L.; SU, Y.; LI, H.; SUN, Q.; LIANG, X.; LV, J. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 29, p. 5194-5201, December, 2011.
- ZHANG, T.; JEONG, C. H.; CHENG, W. N.; BAE, H.; SEO, H. G.; PETRIELLO, M. C.; HAN, S. G. Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. **Food Science and Technology**, p. 276–284, 2019.