



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**REBECA AYALA ROSA DA SILVA**

**VIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPAS DE FRUTAS  
CONGELADAS**

Salvador  
2018

**REBECA AYALA ROSA DA SILVA**

**VIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPAS DE FRUTAS  
CONGELADAS**

Dissertação apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alaíse Gil Guimarães  
Co-orientador: Prof. Dr. Gabriel Vinderola

Salvador  
2018

da Silva, Rebeca Ayala Rosa  
VIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPAS DE FRUTAS  
CONGELADAS / Rebeca Ayala Rosa da Silva. -- Salvador, 2018.  
55 f.

Orientadora: Alaíse Gil Guimarães.

Coorientador: Gabriel Vinderola.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência  
de Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de  
Farmácia, 2018.

1. Alimento funcional. 2. Lactobacillus casei. 3.  
Lactobacillus acidophilus. 4. Lactobacillus plantarum 299v. I.  
Guimarães, Alaíse Gil. II. Vinderola, Gabriel. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

REBECA AYALA ROSA DA SILVA

### VIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 26 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup>. Aláise Gil Guimarães  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora

---

Dr<sup>a</sup>. Adriane Elisabete Antunes de Moraes  
Universidade Estadual de Campinas

---

Dr. Carlos Pasqualin Cavalheiro  
Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho a minha família, amigos e mestres que acreditaram no meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida me dando a força fundamental para continuar minha caminhada.

À minha querida orientadora, Professora Aláise Gil Guimarães, que me acolheu em seu laboratório, confiou no meu trabalho, vestiu o jaleco e foi pra bancada (literalmente) e me deu apoio incondicional. Faltam até palavras para agradecer por tudo que aprendi com seu exemplo de profissionalismo, caráter e ética. Irei guardar todos os momentos, pois todos foram bons.

Ao meu coorientador, Professor Gabriel Vinderola, por ser essa pessoa extremamente solícita, disposta a me ajudar e a sanar minhas inúmeras dúvidas, por se fazer presente sempre, mesmo a quilômetros de distância. Sem ele esse trabalho não teria esse título. Um ser humano de um profissionalismo e dedicação sem igual.

À minha mãe acadêmica, Professora Norma Evangelista-Barreto que me fez despertar para o amor à microbiologia, que insistiu para que eu não desistisse da minha caminhada acadêmica e para que esse momento se tornasse real. Minha gratidão por acreditar no meu potencial, pelo carinho e dedicação de anos, que mudou não apenas a minha trajetória universitária, mas principalmente, a minha vida.

Às pessoas que colaboraram com este estudo, tornando o possível, aos meus queridos do LEMA Palloma (Gêmea), Cezar, Lucas, Johnson, Priscila, Ludimyla e, em especial, Lisandra Nunes que por vários meses foi os meus braços direito e esquerdo no laboratório.

Aos meus familiares que, mesmo sem entender minhas escolhas, estiveram ao meu lado, em especial meu Pai, minha Mãe, minha Irmã Raiane e minha Avó e Intercessora Mariá (minha Vó, ora aí!).

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia, com quem compartilhei bons momentos na minha formação, em especial meus amigos na praça Tami, Mira 1, Mira 2, Léo e Marcelo (vocês são d+!).

Ao meu namorado Rodrigo por se fazer presente todos os dias dessa caminhada, e sua querida família pelas demonstrações de apoio.

Às minhas colegas da turma 2016.1 do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelos bons momentos de aprendizagem profissional e pessoal juntas, em especial as minhas mosqueteiras Sidi e 'Gêmea'. Também aos colegas Renata, Pedro e Ícaro pela constante ajuda.

Aos meus amigos por compreenderem esse momento.

Aos colegas do LASAB por me apoiarem neste período de idas e vindas, em especial Bella, Binha, Well e todos os queridos estagiários.

Aos Professores da Banca Avaliadora por aceitarem o convite de participação, pelas contribuições e considerações feitas a este trabalho.

Aos demais professores que até aqui colaboraram com a minha formação.

*“Mais vale um amigo na praça do que  
dinheiro no bolso.”*

Provérbio Português

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1</b> - Microrganismos usados como probiótico. Adaptado: SAAD et al., 2013.....	19
---	----

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Evolução do pH nas diferentes combinações de polpas de frutas e culturas probióticas durante a estocagem a -20 °C por 336 dias.....	50
<b>Tabela 2.</b> Resultado do teste sensorial triangular para detecção de diferença sensorial nas combinações de polpas de mangas com culturas probióticas.....	52



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1</b> - Microscopia de lâminas de <i>Lactobacillus</i> (A) <i>L. acidophilus</i> ; (B) <i>L. plantarum</i> ; (C) <i>L. casei</i> Shirota.....	20
---	----

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1.</b> Viabilidade (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) do <i>Lactobacillus acidophilus</i> Howaru® em polpas de frutas durante a estocagem a -20 °C por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).....	46
---	----

<b>Figura 2.</b> Viabilidade (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) do <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v® em polpas de frutas durante a estocagem a -20 °C por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).....	46
---	----

<b>Figura 3.</b> Viabilidade (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) do <i>Lactobacillus casei</i> Shirota® em polpas de frutas durante a estocagem a -20 °C por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).....	47
--	----

<b>Figura 4.</b> Viabilidade (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) do <i>Lactobacillus casei</i> Defensis® em polpas de frutas durante a estocagem a -20 °C por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).....	47
---	----

<b>Figura 5.</b> Viabilidade (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) na resistência a digestão gástrica simulada (1- solução salivar; 2- 30 minutos pH 2,5; 3- 60 minutos pH 2,5; 4- 90 minutos pH 2,5; 5- solução bile; 6- solução bile+pancreatina) em polpas de manga e leite com <i>L. acidophilus</i> e <i>L. plantarum</i> durante a estocagem a -20 °C por após um dia de congelamento (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).....	51
--	----

<b>Figura 6.</b> Viabilidade (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) na resistência a digestão gástrica simulada (1- solução salivar; 2- 30 minutos pH 2,5; 3- 60 minutos pH 2,5; 4- 90 minutos pH 2,5; 5- solução bile; 6- solução bile+pancreatina) em polpas de manga e leite com <i>L. acidophilus</i> e <i>L. plantarum</i> durante a estocagem a -20 °C por após 168 dias de congelamento (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).....	51
--	----

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	14
OBJETIVOS .....	15
<b>CAPÍTULO I</b>	
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS E O MERCADO CONSUMIDOR.....	16
1.2. MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	17
1.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	20
1.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	20
1.2.3. <i>Lactobacillus casei</i> .....	21
1.2.4. Ingestão Recomendada.....	21
1.2.5. Efeitos Associados à Ingestão de Probióticos.....	21
1.3. APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS.....	22
1.3.1. Viabilidade.....	23
1.3.1.1. Aspectos Tecnológicos: congelamento.....	24
1.3.1.2. Resistência gástrica intestinal.....	25
1.3.2. Aceitação.....	25
1.3.3. Desenvolvimento de Novas Matrizes Alimentares Probióticas.....	26
1.4. FRUTAS.....	28
1.4.1. Cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.).....	30
1.4.2. Acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> DC).....	30
1.4.3. Goiaba ( <i>Psidium guajava</i> L.).....	31
1.4.4. Manga ( <i>Mangifera indica</i> L.).....	31
REFERÊNCIAS.....	33

## **CAPITULO II - SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS**

RESUMO.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
2.1.Obtenção das Polpas.....	42
2.2.Cepas.....	42
2.3.Preparação das Polpas de Frutas Congeladas com Probióticos.....	42

2.4.Análise da Viabilidade dos Microrganismos Probióticos em Polpas de Frutas	42
2.5.Determinação de pH.....	43
2.6.Teste de Resistência a Digestão Gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	43
2.7.Análise Sensorial.....	44
2.8.Análise dos Dados.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4. CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS.....	53

## RESUMO

Os alimentos funcionais têm ganhado popularidade no mercado consumidor, destacam-se aqueles que possuem entre seus ingredientes os microrganismos probióticos, sendo os leites fermentados os principais carreadores. Quando ingeridos vivos e em quantidades suficientes ( $>6-7 \log$  UFC/g ou mL) os probióticos são capazes de conferir diversos benefícios à saúde do hospedeiro. Para se adquirir tais benefícios a ingestão desses deve ser diária ou ao menos com alta frequência, o que é um desafio para o setor de alimentos que constantemente estuda novas matrizes alimentares como veículo de probióticos. Os derivados de frutas destacam entre as novas matrizes alimentares de probióticos mais pesquisados devido, principalmente, a grande aceitação dos consumidores. Neste cenário surgem as polpas de frutas, que têm qualidades atrativas para introdução dos probióticos, pois tem um custo acessível e são consumidas frequentemente por grande parte da população brasileira. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho de polpas de frutas congeladas como matriz alimentar para os microrganismos probióticos. Primeiramente, foram acrescentadas, separadamente, culturas probióticas às polpas de frutas de sabores escolhidos aleatoriamente, como cacau, acerola, goiaba e manga. No estudo as culturas utilizadas foram *Lactobacillus acidophilus* Howaru, *L. plantarum* 299v, *L. casei* Shirota e *L. casei* Defensis. A enumeração das células viáveis foi realizada pela técnica de diluição seriada e contagem direta em placa utilizando Agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), e ocorreu logo após o acréscimo da cultura, e após um, sete, 14, 28, 56, 84, 168 e 308 dias de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram avaliados também o pH das polpas durante o armazenamento. As polpas que demonstraram melhor desempenho no teste de viabilidade foram testadas quanto a resistência as barreiras biológicas *in vitro* e avaliadas sensorialmente. Neste estudo apenas as polpas de manga mantiveram altas contagens de células probióticas viáveis durante todo o período de armazenamento. A viabilidade das células nas demais polpas de goiaba, acerola e cacau foram aceitáveis nos períodos de 56, sete e um dia de armazenamento, respectivamente. Não houve diferença no pH das polpas com probióticos durante o armazenamento, já a resistência gástrica intestinal *in vitro* foi menor ao longo deste período. Além disso foi possível detectar que o acréscimo do *L. plantarum* não promoveu interferência no sabor da polpa de manga. Sendo assim o acréscimo de culturas probióticas em algumas polpas de fruta pode gerar inovação para o mercado de probióticos e agregar valor ao produto.

**Palavras-chave:** Alimento funcional. *Lactobacillus casei*. *L. acidophilus*. *L. plantarum* 299v.

## ABSTRACT

Functional food have gained popularity in the consumer market, especially those that have probiotic microorganisms among their ingredients, being fermented milk the main carrier. When ingested alive and in sufficient quantities ( $> 6-7 \log$  CFU/g or mL) probiotics are able to provide several health benefits to the host. To acquire such benefits the intake of them should be daily or at least with high frequency, which is a challenge for the food industry that constantly studies new food matrices as a vehicle for probiotics. The fruit derivatives stand out among the new food matrices of probiotics most studied, mainly due it's great acceptance of the consumers. In this scenario fruit pulps appear, which have attractive qualities for the introduction of probiotics, since they are affordable and are frequently consumed by a large part of the Brazilian population. Therefore, the goal of the current study was to evaluate the performance of frozen fruit pulps as a food matrix for probiotic microorganisms. First, probiotic cultures were separately added to fruit pulps of randomly chosen flavors, such as cocoa, acerola, guava and mango. In this study the cultures used were *Lactobacillus acidophilus* Howaru, *L. plantarum* 299v, *L. casei* Shirota and *L. casei* Defensis. The enumeration of the viable cells was performed by the serial dilution technique and direct plate counting using Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRS), and occurred after the addition of the culture, and after one, seven, 14, 28, 56, 84, 168 and 308 days of freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The pH of the pulps were also evaluated during storage. The pulps that demonstrated the best performance in the viability test were tested for resistance to biological barriers in vitro and evaluated sensorially. In this study only mango pulps maintained high counts of viable probiotic cells throughout the storage period. The viability of the cells in the other pulps of guava, acerola and cacao were acceptable in the periods of 56, seven and one day of storage, respectively. There was no difference in pH of the pulps with probiotics during storage, however, in vitro intestinal gas resistance was lower throughout this period. Besides that, it was possible to detect that the addition of *L. plantarum* did not promote interference in the taste of mango pulp. Therefore, the addition of probiotic cultures in some fruit pulps can generate innovation for the probiotic market and add value to the product.

**Key-Words:** Functional food. *Lactobacillus casei*. *L. acidophilus*. *L. plantarum* 299v.

## INTRODUÇÃO

O mercado dos alimentos funcionais vem crescendo consideravelmente nos últimos tempos, isso se deve principalmente a preocupação dos consumidores em ter uma dieta baseada em alimentos saudáveis. Dentro do mercado dos funcionais destacam-se os alimentos probióticos, normalmente veiculados em produtos derivados do leite, principalmente leites fermentados e, em menor frequência, queijos com alto teor de água (SAAD, 2006; SIRÓ et al., 2008; SYBESMA; KORT; LEE, 2015).

Os probióticos quando ingeridos em quantidades suficientes, de  $10^6$  –  $10^7$  Unidade Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro ou grama de produto, são capazes de gerar benefícios a quem os consome, melhorando principalmente as defesas do organismo contra infecções. Visando atingir os consumidores que não consomem derivados do leite, a indústria de alimentos busca novas matrizes alimentares que mantenham os níveis de contagem de células viáveis para que o produto seja considerado um alimento probiótico e alcance este grupo de consumidores (SHAH, 2007; KANDYLIS et al., 2016).

Pesquisas têm demonstrado que os derivados das frutas, principalmente, os sucos têm alcançado bons resultados tanto como veiculadores das células probióticas quanto na aceitação dos consumidores, que veem as frutas como um alimento saudável e consomem este alimento frequentemente (SANTOS et al., 2008; CÉSPEDES et al., 2013;; VASCONCELOS et al., 2014).

Uma das formas de comercialização das frutas para bebidas é a polpa de fruta, que tem se tornando comum dentro do mercado de alimentos pela facilidade de processamento e pela possibilidade de manter viável as características das frutas com armazenamento prolongado sob temperaturas de congelamento (BUENO et al., 2002; MACHADO et al., 2007 e ABREU et al., 2011).

O mercado de alimentos probióticos em países em desenvolvimento ainda é precário, por isso investigar a incorporação em alimentos locais pode aumentar o acesso desses alimentos nessas comunidades (SYBESMA; KORT; LEE, 2015). Diante dessa realidade surgem as polpas de frutas e a necessidade de investigar este alimento como veículo probiótico, podendo agregar valor ao produto, possibilitando o acesso de alimentos probióticos no mercado interno brasileiro e também podendo aumentar o fluxo de exportação deste produto.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho das polpas de frutas como matriz alimentar para microrganismos probióticos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a viabilidade de diferentes culturas de probióticos em diferentes tipos polpas de frutas durante o armazenamento.
- Verificar alterações no pH das polpas com probiótico ao longo do período de armazenamento.
- Avaliar sensorialmente as polpas de fruta de manga com microrganismos probióticos, *L. acidophilus* e *L. plantarum*.
- Verificar a resistência de culturas incluídas nas polpas de manga com microrganismos probióticos, *L. acidophilus* e *L. plantarum* em teste gastrointestinal *in vitro*.

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS E O MERCADO CONSUMIDOR

Nas últimas décadas os alimentos não têm sido consumidos apenas para satisfazer a necessidade nutricional, mas por uma preocupação real do consumidor em se alimentar com nutrientes que forneçam elementos necessários para prevenção de doenças e que promovam o bem-estar físico e mental. Essa consciência da relação entre a nutrição e a saúde, onde o consumidor busca cada vez mais uma evolução na qualidade e expectativa de vida, tem elevado a procura por alimentos funcionais (SIRÓ et al., 2008).

Apesar de não haver um consenso sobre sua definição, alguns autores aceitam que, os alimentos funcionais são aqueles que além dos nutrientes básicos possuem ingredientes que promovem importantes mudanças fisiológicas no corpo por mecanismos que vão além da nutrição convencional (SAAD, 2006; GRANATO et al., 2010).

Os cientistas japoneses foram os primeiros a estudarem a relação entre nutrição, satisfação sensorial, fortalecimento e seu potencial para impedir infecção dos sistemas fisiológicos. Dessa forma, o termo 'alimento funcional' foi utilizado pela primeira vez na década 1980 no Japão devido a essa produção de alimentos fortificados com constituintes especiais que possuíam tais efeitos fisiológicos benéficos. Entre os anos de 1988 e 1998 o mercado japonês possuía mais de 1.700 produtos com alegação funcional (SAAD et al., 2013).

O desenvolvimento e comércio dos alimentos funcionais é considerado complexo, caro e arriscado, pois estes precisam possuir condições técnicas de fabricação, cumprimento a legislação vigente e, principalmente, devem agradar ao consumidor. Estudos relacionados a estes produtos têm crescido, no ano de 2008 o mercado de alimentos funcionais já era equivalente a 5% do mercado de alimentos e bebidas (SIRÓ et al., 2008; SYBESMA; KORT; LEE, 2015).

O mercado consumidor mundial tem despendido anualmente bilhões de dólares tendo em vista a obtenção de uma alimentação saudável, estima-se que só no ano de 2013 o mercado funcional tenha arrecadado US \$ 176,7 bilhões no mundo todo, com potencial crescimento de 10% ao ano. O maior mercado de



alimentos funcionais é o dos Estados Unidos, seguido pela Europa e Japão. Na América Latina o mercado de alimentos funcionais é considerado ainda emergente, fato que está atrelado aos baixos níveis de conhecimento da população sobre nutrição e a renda limitada que os impede de adquirir tais produtos. Neste cenário o Brasil e o México se destacam com maior potencial de ascensão no consumo de alimentos funcionais, devido as suas crescentes economias (GRANATO et al., 2010; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Segundo Saher e colaboradores (2004) a imagem dos alimentos funcionais é positiva e está principalmente ligada aos benefícios a saúde, com isso o seu consumo está atrelado a prevenção dos problemas de saúde, o que torna possível agregar importância ao produto, uma vez que o alimento com alegação funcional tem maior valor de mercado do que os produtos convencionais, sendo bastante atrativo para indústria de alimentos.

Existem várias formas de suplementar um alimento afim de que este se torne um alimento funcional, a fortificação pode se dar pela adição de vitaminas, minerais e/ou micronutrientes. Os probióticos estão entre os principais aditivos que compõem os alimentos funcionais, constituindo entre 60-70% do mercado de alimentos funcionais, tendo bastante aceitação pelos consumidores devido aos efeitos benéficos associados ao consumo de alimentos contendo tais microrganismos (CHAMPAGNE; RAYMOND; GAGNON, 2008; TRIPATHI; GIRI, 2014). Em 2004, 56% do total de alimentos funcionais eram enriquecidos com probióticos. No Brasil, 65% dos alimentos funcionais vendidos no ano de 2007 eram produtos probióticos, o que gerou uma arrecadação em torno de US \$ 325 mil (SAAD, 2006; SIRÓ et al., 2008; GRANATO et al., 2010).

## 1.2. MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

A palavra probiótico, tem origem na língua grega e significa “para vida”, foi utilizada pela primeira vez no século 20, já o seu conceito só passou a ser discutido na década de 60 (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). Atualmente a FAO/WHO (2002) define que os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são os mais frequentemente empregados como suplementos probióticos para alimentos, isto porque há um maior

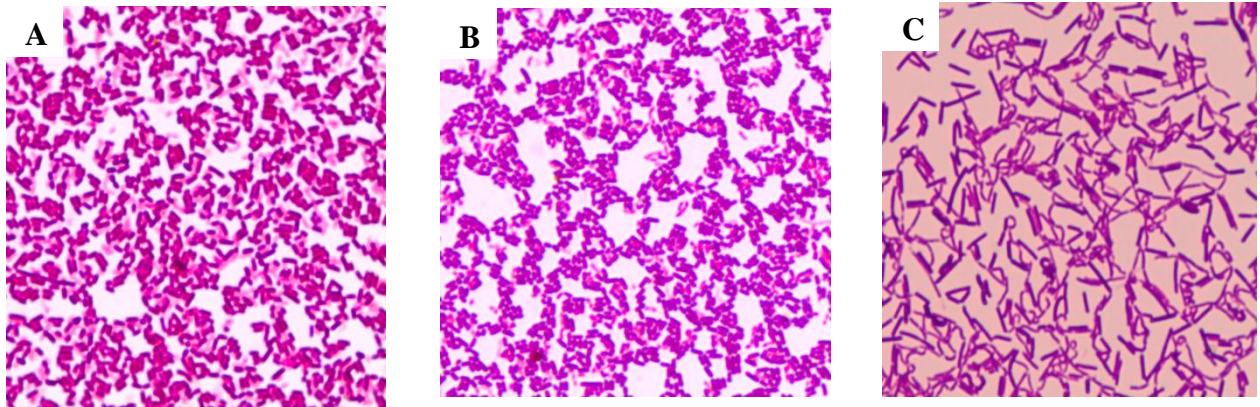
número de estudos disponíveis sobre seus mecanismos *in vitro*, em ensaios clínicos e em teste *in vivo*. Essas bactérias têm sido isoladas do trato gastrointestinal de humanos saudáveis (SAAD, 2006). Em menor escala outras espécies de microrganismos pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Saccharomyces*, *Propionibacterium* e *Enterococcus* também são utilizadas como probióticos (SHAH, 2007; FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013).

Entre as linhagens de bactérias probióticas já presentes no mercado dos alimentos probióticos estão: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. amylovarus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. salivarius subsp. salivarius*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. paracasei subsp. tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. lactis*, (GRANATO et al., 2010; KANDYLIS et al., 2016). Essas e outras espécies de bactérias com alegação probiótica foram demonstradas na Tabela 1 (SAAD et al., 2013).

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e possui 56 espécies, caracterizadas por serem Gram positivas, com morfologia de bastonetes (Figura 1), não esporogênicas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas, podem ser homofermentativas, produzindo 85% de ácido láctico, ou heterofermentativas, produzindo ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e/ou ácido acético. Tem como *habitat* natural a cavidade oral, o trato digestório de humanos e genitália feminina. Bastante utilizado como fermentador láctico esses microrganismos têm sido empregados em vários produtos alimentares com alegação probiótica, sendo comumente reconhecidos como seguros. São considerados mais resistentes do que os do gênero *Bifidobacterium*, sendo encontrados em maior escala nos alimentos probióticos fermentados por serem mais resistentes ao pH baixo e possuírem maior adaptação aos alimentos, sendo tecnologicamente mais adequados (SILVA et al, 2010; ARGYRI et al., 2013; TRIPATHI; GIRI, 2014).

**Tabela 1.** Principais microrganismos com utilização como probiótico em alimentos.  
Adaptado: SAAD et al., 2013.

<b>Lactobacillus</b>	<b>Bifibactrium</b>	<b>Outras Bactérias Ácido lácticas</b>	<b>Outras</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa Nissle
<i>L. amylovarus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>boulevardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. salivarius</i>			



**FIGURA 1.** Microscopia de lâminas de *Lactobacillus* (A) *L. acidophilus* Howaru; (B) *L. plantarum* 299v; (C) *L. casei* Shirota. Fonte: Próprio autor.

#### 1.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Cepas específicas da espécie *L. acidophilus* têm propriedades probióticas. Esta espécie de BAL pode ser isolada do trato gastrointestinal e aparelho genital feminino de humanos e animais. Produzida comercialmente desde a década de 70, tem sido incorporada ao longo deste tempo em alimentos, principalmente de origem láctea, sendo recentemente empregada em leite de soja, carne e legumes fermentados e sucos de frutas. É um microrganismo homofermentativo em condições anaeróbias e heterofermentativo quando em condição facultativa. Os compostos antimicrobianos produzidos por esse microrganismo incluem ácidos orgânicos, peróxidos de hidrogênio, diacetil, amônia e bacteriocinas (ALTERMANN et al., 2005; GOPAL, 2011).

#### 1.2.2. *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* é uma BAL, certas linhagens dessa espécie possuem propriedades probióticas, são originárias da mucosa intestinal humana, comumente encontrada em frutas e vegetais e também utilizada em diversos alimentos fermentados, pode ser isolada da boca ou reto da maioria dos indivíduos saudáveis desde que seja ingerida na alimentação. Possui grande potencial de crescimento em diferentes nichos ambientais, sendo também capaz de sobreviver aos mecanismos de barreiras biológicas, conseguindo alcançar o intestino humano após resistirem ao

pH baixo e aos sais biliares (VRIES et al., 2006; DONG et al., 2017; EMSER et al., 2017).

### 1.2.3. *Lactobacillus casei*

*L. casei* é uma espécie intimamente relacionada filogeneticamente e fenotipicamente com o *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, sendo os principais constituintes da mucosa intestinal humana (REALE et al., 2015). São culturas comumente usadas como *starter* na fermentação de leites e derivados, bem como cultura complementar não iniciantes para intensificação e aceleração do desenvolvimento de características organolépticas e probióticas em queijos e outros lácteos (BURITI; SAAD, 2007).

### 1.2.4. Ingestão Recomendada

Para que um alimento contendo probiótico seja funcional a dose mínima de ingestão diária requerida deve ser de mais ou menos 100 mL ou gramas de um produto que tenha  $10^6$  a  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou mililitro do produto (SAAD, 2006; TRIPATHI; GIRI, 2014). A legislação brasileira chegou a estabelecer que um alimento para alegação probiótica deveria apresentar uma quantidade mínima de  $10^8$  -  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2002; ANVISA, 2008). Em nova recomendação da ANVISA (2016), a agência sugere a apresentação de um laudo de análise que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo capaz de exercer a capacidade funcional até o final do prazo de validade do produto.

### 1.2.5. Efeitos Associados à Ingestão de Probióticos

Considerados bioterapêuticos, bioprotetores, ou bioprolifáticos devido a melhoria das propriedades da microbiota nativa, inúmeros benefícios estão associados aos produtos que contém os microrganismos probióticos, estes benefícios irão depender principalmente da cepa utilizada (COELHO; OLIVEIRA, 2009).

Os efeitos dos microrganismos probióticos podem ser alcançados diretamente com a interação do microrganismo vivo ingerido e o hospedeiro ou indiretamente pelo efeito biogênico, por meio da ingestão de metabólitos produzidos pelos

probióticos durante o processo de fermentação do alimento (TRIPATHI; GIRI, 2014). Os efeitos mais importantes associados à ingestão de probióticos pode se destacar: a redução do colesterol sérico (prevenção da arteriosclerose), melhoria no metabolismo da lactose em indivíduos com intolerância a esse carboidrato, propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, supressão de tumores, redução de compostos tóxicos no organismo, estimulação do sistema imunológico, melhoria nas doenças inflamatórias do intestino, regulação do fluxo intestinal, supressão de infecções do trato gastrointestinal por bactérias, vírus, *Candida enteritis* e *Helicobacter pylori*, melhoria na constipação e síndrome do intestino irritável (regulação da mobilidade intestinal), diminuição da diarreia induzida por quimioterapia, aumento na absorção de nutrientes e minerais (tais como Fe, Ca e Mg), prevenção de osteoporose, síntese de ácido fólico, niacina, riboflavina, vitaminas B6 e B12, melhoria no desenvolvimento (crescimento) e no bem-estar (SHAH, 2007; GRANATO et al., 2010).

A ingestão de probióticos ainda pode auxiliar na diminuição da apoptose de células epiteliais e aumentar a produção de mucina, e de peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas e microcinas (produzindo um ambiente intestinal menos favorável para agentes microbianos patogênicos), competição por nutriente com outros microrganismos, adesão as células epiteliais de uma forma competitiva (bloqueando direta ou indiretamente a adesão de outros microrganismos), podendo também interferir no processo de comunicação dos microrganismos patogênicos.(SAAD et al., 2013; KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

### 1.3. APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS

Atualmente a principal aplicação dos microrganismos probióticos é em alimentos (FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013). Algumas características específicas devem ser consideradas para que um microrganismo probiótico seja introduzido em matriz alimentar, tais como, ser preferencialmente habitante da microbiota intestinal humana, interagir com a microbiota residente, produzir substâncias antimicrobianas, resistir a fabricação e estocagem do produto mantendo a sua viabilidade, e, às barreiras biológicas (secreções: salivar, gástrica, intestinal, biliar e pancreática) atingindo o intestino ainda vivos sendo capaz de colonizar temporariamente a mucosa intestinal e promover a imunoestimulação sem efeitos inflamatórios, e também que tenham efeitos benéficos e seguridade comprovados, não sendo tóxico,

mutagênico ou cancerígeno no organismo do hospedeiro, ser geneticamente estável, não possuindo mecanismos de transferência de plasmídeo ou resistência a antimicrobianos (DE VUYST; FALONY; LEROY, 2008; GRANATO et al., 2010).

Além disso, é fundamental que a dose mínima de células viáveis na matriz alimentícia com probiótico seja respeitada ao ser ingerida e que as características sensoriais sejam agradáveis ao consumidor. Segundo Granato e colaboradores (2010), a viabilidade dos probióticos desde a sua incorporação até o último dia de prateleira do alimento, bem como a aceitação pelo consumidor são os dois pontos-chaves para o sucesso de um novo produto probiótico.

### 1.3.1. Viabilidade

É necessário que a viabilidade da célula seja garantida no momento do consumo. Esta viabilidade das células probióticas é altamente dependente da temperatura de armazenamento e dos componentes da matriz alimentar, incluindo aditivos utilizados e a possibilidade de interação entre as cepas com possíveis componentes do alimento (CÉSPEDES et al., 2013).

De acordo com Vinderola e colaboradores (2002) o pH baixo, a presença de aditivos, conservantes e outros compostos potencialmente antimicrobianos característicos do próprio alimento são alguns fatores limitantes para a sobrevivência do microrganismo probiótico nos alimentos, sendo um fator que causa o decréscimo no número de células probióticas no alimento e devem ser levados em consideração na fabricação de um novo produto probiótico.

Para manutenção da viabilidade das células dos microrganismos durante todo o tempo de armazenamento, a escolha da matriz alimentar e a seleção da cultura probiótica empregada são fatores fundamentais para que haja estabilidade da viabilidade, isto dependerá principalmente da interação alimento-microrganismo (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

A seleção da cepa a ser incorporada irá depender também da sua adequação as condições tecnológicas de processamento e armazenamento do produto desenvolvido, mantendo-se também viável durante o trânsito intestinal e, ao final, tragam os benefícios à saúde desejáveis ao consumidor (CRUZ et al., 2009; TRIPATHI; GIRI, 2014).

### 1.3.1.1. Aspectos Tecnológicos: congelamento

Questões tecnológicas podem afetar a viabilidade das culturas probióticas durante o processo de produção e ao longo do tempo de armazenamento, devendo ser abordadas e testadas para formulação de produtos probióticos. Várias técnicas foram implementadas visando garantir a viabilidade dos probióticos, entre elas o encapsulamento, adição de diferentes protetores, alteração nas condições de processamento e armazenamento (TRIPATHI; GIRI, 2014; KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

As condições tecnológicas podem reduzir significativamente a viabilidade do probiótico devido a aplicação de calor, danos mecânicos ou lesões celulares causadas pelo estresse osmótico. Mas algumas técnicas de processamento podem favorecer a manutenção das células probióticas viáveis na dose recomendada, entre elas a fermentação é o processo tecnológico mais aplicado em alimentos probióticos. A secagem, microencapsulação e o congelamento são técnicas que também demonstram bons resultados quanto a viabilidade dos probióticos. (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

A técnica de congelamento consiste na aplicação de baixas temperaturas ( $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ), mantendo as moléculas em um estado mais estável e, com isso, aumentando a vida de prateleira do produto. Os microrganismos podem sobreviver a um maior período de tempo em produtos congelados, isto porque o metabolismo e as atividades vitais das células são reduzidos ou interrompidos (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007).

Entretanto, a parede celular e a membrana dos probióticos podem ser danificadas durante o processo de congelamento devido às tensões mecânicas dos cristais de gelo formados no meio externo ou no interior da célula e/ou pelos efeitos osmóticos do descongelamento, podendo causar lesões fatais as células bacterianas (CRUZ et al., 2009).

Para sanar tais efeitos sugere-se que seja realizado o congelamento rápido que formará cristais de gelo de menor tamanho auxiliando na manutenção dos microrganismos no produto e que açúcares (como lactose e sacarose, que têm comprovado impacto positivo na aplicação de diversos processos tecnológicos) sejam incorporados ao produto de modo que amenize os efeitos do descongelamento (SCHMIDT; PEREIRA, 2011; THRIPATHI; GIRI, 2014).



As culturas probióticas, de forma cepa-dependente, são capazes de manter sua estabilidade em alimentos congelados, com perda mínima de viabilidade, apresentando boa resistência às condições gástricas intestinais e sem alterar as características sensoriais do produto (CRUZ et al., 2009).

#### 1.3.1.2. Resistência gástrica intestinal

Um dos requisitos básicos para que um microrganismo seja considerado um bom probiótico é a sua sobrevivência as condições adversas do trato gastrointestinal humano, como o baixo pH estomacal e a presença de bile na entrada do intestino. Os probióticos presentes no alimento devem ser capazes de sobreviver a passagem pelo trato digestório, resistindo a exposição ao suco gástrico e a bile, chegando vivos e com capacidade de proliferarem e colonizarem temporariamente o intestino (SAAD et al., 2013; KANDYLIS et al., 2016).

Como o intestino grosso é o local de ação para a maioria das bactérias probióticas, elas devem chegar viáveis em quantidade suficiente ao seu local de ação, para que sejam eficazes. Mesmo que uma cepa se mostre viável durante o armazenamento, suas características funcionais como a resistência ao pH baixo, adesão ao epitélio intestinal ou a capacidade de imunomodulação podem não ser totalmente exercidas, comprometendo sua capacidade de exercer benefícios a saúde de quem os consome (BURNS et al., 2014).

A resistência gástrica das bactérias probióticas pode ser influenciada pela matriz alimentar e o tempo e temperatura de armazenamento. Pode ser que ocorra uma adaptação das células com maior chance de sobrevivência ao pH baixo do estômago, quando estas forem submetidas ao pH baixo de determinado alimento durante o armazenamento sob refrigeração. No entanto o stress promovido pelas baixas temperaturas de exposição pode sensibilizar essas células probióticas ao ponto delas perderem a resistência a essas barreiras biológicas e, conseqüentemente, sua funcionalidade (VINDEROLA et al., 2011; CÉSPEDE et al., 2013; KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

#### 1.3.2. Aceitação

A análise sensorial permite observar quais características dos alimentos são mais afetadas quando se acrescenta o probiótico. Em civilizações orientais a função

de um alimento é superior em relação ao sabor, porém em culturas ocidentais o conceito é diferente, sendo comum adicionar funcionalidade a um produto já existente no mercado (SIRÓ et al., 2008).

A presença de probióticos pode ter um impacto negativo nas características de suas propriedades sensoriais (TRIPATHI; GIRI, 2014). Normalmente, os consumidores associam os alimentos saudáveis a um sabor inaceitável e admitem que o prazer sensorial precisa ser sacrificado em prol de uma dieta saudável. Desta forma é importante conhecer o impacto sensorial das culturas probióticas sobre os produtos não lácteos e a sua influência na aceitação do consumidor e a preferência por sucos de frutas (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004).

Sabe-se que manter as características sensoriais do alimento convencional após o acréscimo do ingrediente que o torna funcional é uma característica fundamental para a aceitação pelo consumidor. O sabor é o principal motivador para seleção do alimento, seguido pelo benefício à saúde. No entanto, aceitação sensorial é muito importante para inserção de um novo produto no mercado e objeto de estudo de muitos pesquisadores (SIRÓ et al., 2008; CRUZ et al., 2009; GRANATO et al., 2010).

Com isso é necessário analisar sensorialmente os impactos do acréscimo de microrganismos probióticos ao alimento, com estudos que tornem possível comparar o impacto de cada cultura probiótica sobre os atributos sensoriais (aparência, aroma, textura e sabor), que ajudem a conhecer o efeito dessas mudanças na aceitação do consumidor (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004).

### 1.3.3. Desenvolvimento de Novas Matrizes Alimentares Probióticas

As principais aplicações de probióticos na indústria de alimentos são em leites fermentados, iogurtes e queijos em menor escala. O sucesso dos produtos probióticos nos leites fermentados se deve principalmente pela imagem positiva deste alimento diante do consumidor, armazenamento a frio (4-8°C), vida de prateleira curta (28 – 35 dias), disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento de microrganismos (SAAD, 2006; GRANATO, et al., 2010; KANDYLIS et al., 2016).

No entanto, o alto teor de colesterol e outros ácidos gordurosos saturados, o alto conteúdo de açúcares, a crescente intolerância a lactose e alergias associadas a proteína do leite vem gerando uma objeção aos alimentos lácteos (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). De acordo com Céspedes e colaboradores (2013)

essa demanda específica entre os consumidores vegetarianos, intolerantes a lactose, alérgicos à proteína do leite ou ainda consumidores que tem uma percepção negativa com relação aos produtos lácteos pela quantidade de sal e por conterem colesterol tem aumentado e levado a diversificação de alimentos probióticos de origem não láctea.

Vale ressaltar que é considerada uma boa matriz alimentar para carregamento de bactérias probióticas aquela que além de manter a bactéria viável na quantidade adequada e que seja frequentemente consumida sendo considerada pelo consumidor como um alimento saudável, independente da presença do probiótico (CÉSPEDES et al., 2013). Além disso, a sensibilidade dos probióticos ao estresse provocado pelos fatores físico-químicos, calor, acidez são desafios para o desenvolvimento de outros tipos de produtos (FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013).

Para atender a demanda por novos produtos alimentícios com propriedade probiótica, pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando alimentos não derivados do leite, principalmente a base de frutas. Martins e colaboradores (2016) avaliaram o potencial da salada de frutas como veiculador de *L. rhamnosus* HN001 constatando que as frutas minimamente processadas obtiveram contagem de probióticos similares aos valores encontrados em fermentados lácteos, constatando uma alta aderência das células probióticas ao tecido das frutas tais como abacaxi, manga e, principalmente, banana, goiaba e maçã.

Vasconcelos e colaboradores (2014) desenvolveram um *mix* de açaí contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, com e sem inulina, conservado a -18°C e observaram contagens iniciais de células viáveis de 6,11 log UFC/g nas duas culturas em ambos os *mixes*. Céspedes e colaboradores (2013), avaliando o desempenho de *L. casei*, normalmente empregadas em produtos lácteos, em bebidas não lácticas refrigeradas concluíram que as culturas probióticas comerciais podem ser adicionadas em sucos de frutas desde que haja cuidado com a seleção do produto específico, que garantam a viabilidade da célula. Seus estudos comprovaram também que incorporadas nessas matrizes as células se mantiveram viáveis nos testes de simulação da digestão gástrica.

Nagpal, Kumar e Kumar (2012), demonstraram que as culturas de *L. acidophilus* e *L. plantarum* são capazes de sobreviver em suco de tomate, laranja e uva por até 72 h com condições de alta acidez e baixo pH, validando o uso de suco

de frutas como veículo ideal para os probióticos. Santos et al. (2008) ao desenvolverem um suco de frutas com adição de  $10^8$  UFC/mL de *L. acidophilus* e 10% de oligofrutose, incubado a 8°C por 8 dias, obtiveram contagem mínima necessária para ser considerado um produto probiótico.

Além de manterem a viabilidade em níveis adequados, os sucos de frutas com probióticos quando avaliados em testes de perfil sensorial, são agradáveis e facilmente aceitáveis. Essas características têm atraído o interesse dos pesquisadores para o desenvolvimento de bebidas probióticas com base em suco de frutas (KANDYLIS et al., 2016).

A veiculação de probióticos em sucos de frutas é ainda reforçada por este alimento ser frequentemente ingerido pelo consumidor, ser considerado um produto saudável, possuir compostos menos alergênicos (do que os lácteos) que causem impedimento de sua ingestão e grande aceitação de consumo (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004; SIRÓ et al., 2008).

#### 1.4. FRUTAS

As frutas constituem uma rica fonte de vitaminas, minerais, antioxidantes, fibras e carboidratos solúveis, por este motivo os sucos de frutas são cada vez mais consumidos por pessoas que buscam o consumo de alimentos saudáveis e são heterogêneas com diferentes características físico-químicas. A industrialização de sucos e polpas de frutas é visto como uma atividade promissora do ramo alimentar, sendo que o Brasil se destaca como um dos maiores produtores de frutas tropicais do mundo, sendo o fornecimento constante da fruta como matéria-prima é uma das condições indispensáveis na elaboração de muitos produtos alimentares (ABREU et al., 2011; KUMAR, VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Uma forma de garantir a disponibilidade das frutas durante todas as épocas do ano é por meio do congelamento da sua polpa. A polpa de fruta congelada é definida como um produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido pelo esmagamento de frutos polposos que atendem diversos segmentos do setor de alimentos, utilizadas para produção de sucos, sorvetes, balas, produtos de confeitaria e lácteos, havendo uma expansão na produção devido a elevação do consumo do mercado interno e externo (BRASIL, 2000; MACHADO et al., 2007).

Considerado uma alternativa para redução das perdas pós-colheita, a produção de polpas de frutas congeladas se tornou uma forma favorável para o

aproveitamento integral das frutas fora de época, sendo também uma maneira de comercialização de frutas perecíveis em grandes distâncias. É um produto de grande potencial mercadológico pelo baixo custo de processamento, vem se destacando no cenário baiano, além de atender um mercado que busca alimentos de preparo rápido e pela variedade de frutas com sabores exóticos bastante agradáveis (BUENO et al., 2002; MACHADO et al., 2007).

Se tratando de alimentos probióticos não lácteos, produtos a base de frutas, além de uma rica fonte de nutrientes, evitam a necessidade de culturas *starter*, diminuindo a competição de nutrientes com culturas probióticas, contêm açúcar que poder ser um fator de proteção para os probióticos, possuem um bom sabor, consumido por indivíduos de todas as faixas etárias, algumas células mostram forte adesão a certos tecidos de frutas, além disso, são digeridas rapidamente, encurtando o tempo de exposição das células probióticas ao ambiente ácido do estômago (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Ao mesmo tempo, as bebidas probióticas não lácteas a base de frutas são uma alternativa mais econômica, tornando-se acessível à população de países em desenvolvimento (KANDYLIS et al., 2016). Sysbesma; Kort; Lee (2015) afirmam que o acesso aos alimentos probióticos ainda é limitado em países em desenvolvimento sendo importante a incorporação dos probióticos em alimentos regionais, com a finalidade de aumentar o acesso a esse tipo de alimento, estimulando também o financiamento da investigação em torno probióticos locais, impulsionado por pesquisas no âmbito acadêmico e industrial.

No entanto, uma das limitações para incorporação dos microrganismos probióticos é o pH baixo das frutas, não bastante a diminuição da viabilidade pode, principalmente, estar relacionada com outros fatores intrínsecos da fruta devido a sua composição, entre eles a quantidade muitas vezes insuficiente de peptídeos e aminoácidos livres necessários a sobrevivência dos microrganismos probióticos (ANTUNES et al., 2013). Sabendo que características do alimento podem comprometer a viabilidade do alimento, a composição da fruta e seu comportamento na inibição de microrganismos devem ser cuidadosamente estudados, afim de que esta composição não atue inibindo o crescimento desejável de microrganismos probióticos (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007; CRUZ et al., 2009; TRIPATHI; GIRI, 2014).

#### 1.4.1. Cacau (*Theobroma cacao L.*)

A cultura agrícola cacaueira é a terceira mais importantes do mundo, originária da bacia amazônica. Noventa por cento do cacau produzido no mundo são cultivados na África tropical, Ásia e América Latina. Este cultivo desempenha papel relevante na estabilidade dos ecossistemas tropicais e na geração de economia para milhões de pequenos agricultores, pois este fruto é a principal material-prima para indústria de chocolate, e arrecada bilhões de dólares ao ano (MAXIMORA et al., 2008; QUINGA et al., 2018). Seu fruto tem forma de vagem com comprimento entre 12 e 30 centímetros, cuja a casca corresponde a 75% do seu peso total e coloração que vai do amarelo ao alaranjado. No interior das vagem estão aproximadamente 30 a 40 grãos que são envolvidos por uma polpa mucilaginosa, de coloração que vai do branco ao marfim e sabor levemente ácido, que corresponde a 40% do peso do grão fresco, muitas vezes utilizada na produção de bebidas. A composição da polpa é basicamente de água, carboidratos e proteínas, tem alta acidez (pH 3,0 – 3,5), rica fonte de ácidos orgânicos, dentre eles o ácido cítrico, e compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias, analgésicas, vasodilatadoras e antimicrobianas (KONGOR et al., 2016; VALADEZ-CARMONA et al., 2018).

#### 1.4.2. Acerola (*Malpighia emarginata DC*)

A acerola é um fruto pequeno, de cor vermelha em estágio maduro e polpa muito suculenta, refrescante e com sabor frutado e doce. Nativa da América Central, sua boa adaptação ao solo e clima brasileiro, tornou o país o maior produtor, consumidor e exportador do mundo. A composição da acerola é basicamente de carboidratos (35,7-78 g.Kg<sup>-1</sup>), proteínas (2,1-8 g.Kg<sup>-1</sup>), lipídios (2,3-8 g.Kg<sup>-1</sup>), fósforo (171 mg.Kg<sup>-1</sup>), cálcio (117 mg.Kg<sup>-1</sup>), ferro (2,4 mg.Kg<sup>-1</sup>), piridoxina (87 mg.Kg<sup>-1</sup>), riboflavina (0,7 mg.Kg<sup>-1</sup>), tiamina (0,2 mg.Kg<sup>-1</sup>), água (906-920 g.Kg<sup>-1</sup>), fibra dietética (30 g.Kg<sup>-1</sup>) e vitamina C (3 e 46 g.Kg<sup>-1</sup>). Esta fruta é uma rica fonte de carotenóides, polifenóis e vitamina C. Os valores de antioxidantes encontrados nos sucos de acerola são maiores do que os relatados em sucos de outras frutas como: morango, uva e maçã. Devido ao seu grande potencial nutricional e econômico, a acerola pode ser

usada em sorvetes, geleias, doces, licores, sucos, refrigerantes, néctar, gelatina, goma, conservas de frutas, nutracêuticos e iogurtes (DE ROSSO; MERCADANTE, 2005; MEZADRI et al., 2006; MEZADRI et al., 2008; BICAS et al., 2011).

#### 1.4.3. Goiaba (*Psidium guajava* L.)

Cultivada nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, a goiaba é uma fruta nativa do México. Com atividades medicinais, sua planta possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, sendo utilizada principalmente no combate a diarreia, gastroenterites, disenteria, enterite por rotavírus, feridas, acne, placa dentária, malária, alergias, tosse, diabetes, desordem cardiovascular, doenças musculares degenerativas, doenças inflamatórias, doenças do fígado, câncer e atuando, também, como antimicrobiano contra agentes patogênicos intestinais e estomacais. Suas frutas são carnudas, coloração amarela, em formato ovoide com cerca de cinco centímetros de diâmetro, com um mesocarpo cor de rosa e numerosas sementes brancas com tamanho pequeno, são altamente nutritivas, boa fonte de cálcio, ferro, fósforo, tiamina, riboflavina, niacina, vitaminas A, B3 e C. Seu teor de vitamina C pode ser de 2 a 5 vezes maior do que as frutas cítricas, com cerca de 0,56 - 6 mg.g<sup>-1</sup> na polpa, dependendo do grau de maturação. Além desses minerais e vitaminas, a goiaba ainda possui na sua composição água (84,9%), carboidrato (13,2%), gordura (0,53%) e proteínas (0,88%). Sua fruta pode ser consumida fresca ou processada em forma de polpas congeladas, sucos, geleias e compotas, assim ampliando sua disponibilidade ao longo do ano. O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de goiaba e a maior parte dessa produção é destinada para o processamento de produtos alimentares (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008; BARBALHO et al., 2012).

#### 1.4.4. Manga (*Mangifera indica* L.)

A manga é uma das frutas tropicais mais importantes do mundo em termos de produção e aceitação do consumidor, é a segunda fruta mais cultivada no mundo, ficando atrás apenas da banana. Originária do sudoeste

Asiático, esta fruta possui mais de 1.000 variedades, seu formato é oval arredondado, com casca de cor que pode ser verde, amarelo, alaranjado ou vermelho a depender da espécie. A polpa tem coloração amarela ou amarelo-alaranjada, sabor doce e levemente ácido, composta por água, açúcares, fibras dietéticas e pequenas quantidades de proteínas e gorduras, e quando maduras seu teor de carboidratos pode ficar em torno de 20,5%. Considerada como um fruto rico em carotenóides, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, triptofano, lisina e minerais esta fruta é consumida principalmente fresca, mas por se tratar de um fruto sazonal sua polpa processada é bastante utilizada no preparo de diversos produtos como purês, compotas em caldas, geleias, polpas congeladas, sucos e néctar (REDDY; REDDY, 2005; RIBEIRO et al., 2008; JAHURUL et al., 2015).



## REFERÊNCIAS

- ABREU, D. A.; SILVA, L. M.; LIMA, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de manga, maracujá e caju adicionadas de prebióticos. **Alimentos e Nutrição**. v. 22, n. 2, p. 197-203, Araraquara, 2011.
- ALTERMANN, E.; RUSELL, W.M.; AZCARATE-PERIL, M.A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.; MCAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DOUNG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T.R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, n. 11, p. 3906-3912, 2005.
- ANTUNES, A.E.C.; LIESERRE, A.M.; COELHO, A.L.A.; MENEZES, C.R.; MORENO, I.; YOTSUYANAGI, K.; AZAMBUJA, N.C. Acerola nectar with added microincasulated probiotic. **LWT – Food Science and Technology**. v. 54, p. 125-131, 2013.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 02 de 07 janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Brasília, 2002.
- ANVISA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. **Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Lista das alegações aprovadas em julho de 2008.
- ANVISA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde**. Lista das alegações aprovadas em dezembro de 2016.
- ARGYRI, A.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.A.G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.J.R.; PANAGOUE, E.Z.; TASSOU, C.C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* test. **Food Microbiology**. v. 33, p. 282-291, 2013.
- BARBALHO, S.M.; FARINAZZI-MACHADO, F.M.; GOULART, R.A.; BRUNNAT, A.C.S.; OTTOBONI, A.M.M.B.; NICOLAU, C.C.T. *Psidium guajava* (guava): a plant of multipurpose medicinal applications. **Medicinal & Aromatic Plants**. v.1, n.4, p. 1-6, 2012.
- BICAS, J.L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; BARROS, F.F.C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**. v. 44, p. 1843-1855, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 1 de 7 de janeiro de 2000. **Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta.** Brasília, 2000.

BUENO, S. M.; LOPES, M. R. V.; GRACIANO, R. A. S.; FERNANDES, E. C. B.; GARCIA-CRUZ, C. H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** v. 62, n. 2, p. 121-126, 2002.

BURITI, F.C.A; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 38, p. 315-317, 2007.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para saúde humana. **Archivos Latinoamericano de Nutricion.** v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

BURNS, P.; LAFFERRIERE, L.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J. Influence of dairy practices on the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. **International Journal of Dairy Technology.** v. 67, n. 3, p. 448-457, 2014.

CÉSPEDES, M.; CÁRDENAS, P.; STAFFOLANI, M.; CIAPPINI, M. C.; VINDEROLA, G. Performance in nondairy drinks of probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products. **Journal of Food Science.** v. 78, n. 5, p. M756 – M762, 2013.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. **Journal of Food Science.** v. 73, n.5, p. 221-226, 2008.

COELHO, A. N.; OLIVEIRA, V. R. Os benefícios dos probióticos, prebióticos e simbióticos na nutrição preventiva. **Revista Higiene Alimentar,** v. 23, n. 172/173, p.24 - 29, 2009.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Research International.** v. 42, p. 1233-1239, 2009.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. **Food research International.** v. 38, p. 1073-1077, 2005.

DE VUYST, L.; FALONY, G.; LEROY, F. Probiotics in fermented sausages. **Meat Science,** v. 80, p. 75–78, 2008.

DONG, A.; HO, V.T.T.; LO, R.; BANSAL, N.; TURNER, M.S. A genetic diversity study of antifungal *Lactobacillus plantarum* isolated. **Food Control.** v. 72, p. 83-89, 2017.

EMSER, K.; BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P.; MORAIS, A.M.M.B. *Lactobacillus plantarum* survival during the osmotic dehydration and storage of probiotic cut apple. **Journal of Functional Foods**. v.38, p. 519-528, 2017.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2002.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risk and challenges. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, p. 284-292, 2013.

GOPAL, P.K. **Lactic Acid Bacteria - *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus***. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2<sup>a</sup> ed. 2011. P. 91-95.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 9, p. 292-302, 2010.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 1-27, 2008.

JAHURUL, M.H.A.; ZAIDUL, I.S.M.; GHAFOOR, K.; AL-JUHAIMI, F.Y.; NYAM, K.; NORULAINI, N.A.N.; SAHENA, F.; MOHD OMAR, A.K. Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: a review. **Food Chemistry**. v.183, p. 173-180, 2015.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**. v. 7, p. 58 – 63, 2016.

KONGOR, J.E.; HINNEH, M.; WALLE, D.V.; AFOAKWA, E.O.; BOECKX, P.; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavor profile – A review. **Food Research International**. v. 82, p. 44-52, 2016.

KUMAR, B.V.; VIJAYENDRA, S.V.; REDDY, O.V.S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. **Journal Food Science and Technology**. v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**. v. 15, p. 751 – 759, 2004.

MACHADO, S. S.; TAVARES, J. T. Q.; CARDOSO, R. L.; MACHADO, C. S.; SOUZA, K. E. P. Caracterização de polpas de frutas tropicais congeladas comercializadas no Recôncavo Baiano. **Revista Ciência Agronômica**. v. 38, n. 2, p. 158 – 163, 2007.

MARTINS, E.M.F.; RAMOS, A.M.; MARTINS, M.L.; LEITE JÚNIOR, B.R.C. Fruit salad as a new vehicle for bacteria probiotic. **Food Science and Technology**. v. 36, n. 3, p. 540-548, 2016.

MAXIMOVA, S.N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; GUILTINAN, M.J. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v. 44, p. 487-493, 2008.

MEZADRI, T.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLAÑO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. The acerola fruit: composition, productive characteristics and economic importance. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 56, n. 2, p. 101-109, 2006.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidants activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 282-290, 2008.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M. Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli. **Annals of Microbiology**. v. 62, p. 1573-1578, 2012.

QUINGA, L.A.P.; HERINGER, A.S.; FRAGA, H.P.F.; VIEIRA, L.N.; SILVEIRA, V.; STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P. Insights into the conversion potential of *Theobroma cacao* L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis. **Scientia Horticulturae**. v. 229, p. 65-76, 2018.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; IACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastrointestinal tract. **LWT – Food Science and Technology**. v. 60, p. 721-728, 2015.

REDDY, L.V.A.; REDDY, O.V.S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 21, p. 1345 – 1350, 2005.

RIBEIRO, S.M.R.; BARBOSA, L.C.A.; QUEIROZ, J.H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**. v. 110, p. 620-626, 2008.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, p. 1 -14, 2006.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. Na overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**. v. 50, p. 1- 16, 2013.

SAHER, M.; ARVOLA, A.; LINDEMAN, M.; LAHTEENMAKI, L. Impressions of functional food consumers. **Appetite**, v. 42, p. 79–89, 2004.

SANTOS, J. S.; XAVIER, A. A. O.; BONEVENTI, P.; SOUZA, R. B.; GARCIA, S. Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose. **Semina: Ciências agrárias**. v. 29, n. 4, p. 839 – 844, Londrina, 2008.

SCHMIDT, L. F.; PEREIRA, K. S. O potencial dos probióticos e prebióticos em bebidas de origem vegetal. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011. cap. 23.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 1262 – 1277, 2007.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁLPONA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**. v. 51, p. 456 – 467, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SYBESMA, W.; KORT, R.; LEE, Y. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Trends in Biotechnology**. v. 33, n. 4, p. 197 – 200, 2015.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional foods**. v. 9, p. 225-241, 2014.

VALADEZ-CARMONA, L.; ORTIZ-MORENO, A.; CEBALLOS-REYES, G.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑES, E. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 131, p. 99-105, 2018.

VASCONCELOS, B. G.; MARTINEZ, R. C. R.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Innovative açai (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science Biotechnology**. v. 23, n. 5, p. 1843 – 1849, 2014.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 579 – 589, 2002.

VINDEROLA, C. G.; CÉSPEDE, M.; MATEOLLI, D.; CÁRDENAS, P.; LESCANO, M.; AIMARETTI, N.; REINHEIMER, J. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**. v. 64, n. 2, p. 269 – 275, 2011.

VRIES, M.C.; VAUGHAN, E.E.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract . **International Dairy Journal**. v. 16, p. 1018-1028, 2006.

## CAPÍTULO II

### SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS

Rebeca Ayala Rosa Da Silva<sup>1</sup>; Palloma de Souza Santos<sup>1</sup>; Tamires Pascoal dos Santos<sup>2</sup>; Alaise Gil Guimarães<sup>3</sup>, Gabriel Vinderola<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Discente do Programa de Pós Graduação Ciência dos Alimentos – UFBA – Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Assistente de Laboratório – UFBA – Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Professor do Programa de Pós Graduação Ciência dos Alimentos – UFBA – Brasil

<sup>4</sup>Professor do Programa de Lactologia Industrial - Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional Del Litoral – Argentina

#### RESUMO

Os alimentos funcionais têm ganhado popularidade no mercado consumidor, destacando-se aqueles que possuem entre seus ingredientes os microrganismos probióticos. Atualmente a maioria dos alimentos que possuem alegação probiótica no mercado são derivados do leite. Buscando atender aos consumidores intolerantes a lactose, com dieta de baixo teor de colesterol, vegetarianos e com restrição alimentar, vários alimentos têm sido testados como matriz alimentar para microrganismos probióticos. As bebidas de origem vegetal têm demonstrado grande potencial para tal emprego. Neste estudo foi determinada a viabilidade dos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* Shirota e *L. casei* Defensinis incorporado à polpa das frutas manga, goiaba, acerola e cacau durante o armazenamento (-20 °C), sendo também monitorados os valores de pH. A resistência a simulação gástrica e avaliação sensorial foram realizadas na polpa que demonstrou melhor desempenho nas contagens de viabilidade. As menores contagens de células probióticas, < 10 UFC/g, foram observadas nas polpas de cacau e acerola para todos os probióticos testados após um e sete dias de congelamento, respectivamente. Já as polpas de manga tiveram as melhores contagens para todos os microrganismos, mantendo a viabilidade das cepas avaliadas da ordem  $\geq 6 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$  durante todo período de armazenamento, se caracterizando uma boa matriz alimentar para um produto de alegação probiótica. Os valores de pH foram constantes durante o armazenamento das polpas, ao longo do período de armazenamento houve um decréscimo nas contagens de células após a simulação gastrointestinal *in vitro*. Sensorialmente os avaliadores não detectaram modificações em polpa de manga incorporadas com *L. plantarum*.

**Palavras-chave:** probiótico, não lácteos, resistência gástrica, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*.

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado dos alimentos funcionais vem crescendo consideravelmente ao longo dos anos, pois na última década os alimentos não têm sido mais consumidos apenas para satisfazer a necessidade nutricional, mas existe uma preocupação real do consumidor em se alimentar com nutrientes que forneçam elementos necessários para prevenção de doenças e que promovam o bem-estar físico e mental (SAHER et al., 2004; SYBESMA; KORT; LEE, 2015).

Dentre esses alimentos funcionais destacam-se os alimentos com alegação probiótica, definidos como aqueles que possuem na sua composição microrganismos viáveis que quando administrados em doses suficientes promovem benefícios à saúde de quem os consomem (FAO/WHO, 2002). Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são os mais frequentemente empregados como suplementos probióticos para alimentos. Essas bactérias têm sido isoladas do trato gastrointestinal de humanos saudáveis, sendo consideradas bioterapêuticas, bioprotetoras, ou bioprolifáticas devido a melhoria das propriedades da microbiota nativa, inúmeros outros benefícios estão associados aos produtos que contém os microrganismos probióticos (SAAD, 2006; FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013).

Entre os efeitos mais importantes associados a ingestão de probióticos pode se destacar seu papel inibitório frente os microrganismos patogênicos, a redução do colesterol, melhoria no metabolismo da lactose em indivíduos com intolerância a esse carboidrato, propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, estimulação do sistema imunológico, melhoria nas doenças inflamatórias do intestino, supressão de infecções pela *Helicobacter pylori*, melhoria na constipação, aumento na absorção de nutrientes e minerais (SHAH, 2007; SAAD et al., 2013; KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

A maioria dos alimentos com alegação probiótica são os derivados do leite, há uma variedade de leites fermentados, iogurtes, queijos e sorvete disponíveis para o consumidor. No entanto a necessidade de atender um público diferenciado como os intolerantes a lactose, dietas com baixo colesterol e com restrição alimentar, tem motivado pesquisas e desenvolvimento de novas matrizes de alimentos para esses microrganismos (GRANATO et al., 2010; ANTUNES et al., 2013; CÉSPEDES et al., 2013)

Para atender tal demanda, pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando produtos não derivados do leite, principalmente a base de frutas, as bebidas a base de frutas vêm se destacando dentro do cenário dos alimentos probióticos, pois estes contém as características necessárias para viabilidade das células e aceitação do consumidor (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004; VASCONCELOS et al., 2014). Os produtos a base de frutas são uma rica fonte de nutrientes, evitam a necessidade de culturas iniciais, o que diminui a competição de nutrientes com culturas probióticas, contém açúcar que é importante para o crescimento de probióticos, possuem um sabor agradável, é frequentemente consumido por indivíduos de todas as faixas etárias, algumas células de microrganismos probióticos mostram forte adesão a certos tecidos de frutas, são digeridas rapidamente, encurtando o tempo de exposição das células probióticas ao ambiente ácido do estômago (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). Os produtos a base de frutas podem ser ainda uma alternativa mais econômica, tornando-se acessível à população de países em



desenvolvimentos o consumo de alimentos probióticos (KANDYLIS et al., 2016; SYBESMA; KORT; LEE, 2015)

Para ser considerado uma boa matriz alimentar, o alimento deve carrear células probióticas viáveis, numa quantidade mínima para que a cepa possa garantir o efeito benéfico, isto significa o consumo diário de mais ou menos 100 mL ou gramas de um produto que tenha  $10^6$  a  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou mililitro do produto (SAAD, 2006; TRIPATHI; GIRI, 2014). O tipo de produto, os ingredientes químicos usados, a possibilidade de interação com a cultura probiótica, o processamento tecnológico e a temperatura de armazenamento do produto são apontados como os fatores principais para manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos durante a vida útil do produto (VINDEROLA et al., 2002; CHAMPGNE et al., 2011).

As condições tecnológicas podem reduzir significativamente a viabilidade do probiótico devido a aplicação de calor, danos mecânicos ou lesões celulares causadas pelo estresse osmótico. Dentre os processamentos tecnológicos de um produto alimentar a aplicação do congelamento em um alimento com alegação probiótica pode demonstrar bons resultados quanto a viabilidade (CRUZ et al., 2009). Esta técnica que consiste na aplicação de baixas temperaturas ( $\leq -18^\circ\text{C}$ ), mantendo as moléculas em um estado mais estável e, com isso, aumentando a vida de prateleira do produto, permitindo que microrganismos sobrevivam a um maior período de tempo em produtos congelados, pois o metabolismo e as atividades vitais das células são reduzidos ou interrompidos (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007).

Além da viabilidade, outro fator determinante para incorporação dos probióticos nas matrizes alimentares é a avaliação sensorial. Normalmente os consumidores associam os alimentos saudáveis a um sabor inaceitável e admitem que o prazer sensorial deva ser sacrificado em prol de uma dieta saudável. Desta forma é importante conhecer o impacto sensorial das culturas probióticas sobre os produtos não lácteos e a influência na aceitação do consumidor e na preferência por sucos de frutas (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004; VASCONCELOS et al., 2014).

De acordo com Kandylis e colaboradores (2016) os sucos de frutas com probióticos quando avaliados em testes de perfil são agradáveis e de boa aceitação. A veiculação de probióticos em sucos de frutas é ainda reforçada por este alimento ser de consumo frequente, ser considerado um produto saudável, não estar tão frequentemente associado à alergia alimentar quanto os produtos lácteos, isto torna menor o impedimento do seu consumo e uma grande aceitação por parte do consumidor (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004; SIRÓ et al., 2008; CÉSPEDE, 2013). Com todas essas características o interesse dos pesquisadores para o desenvolvimento de bebidas probióticas com base em suco de frutas. Para conhecer o desempenho da polpa de fruta como matriz alimentar para microrganismos probióticos, o objetivo deste trabalho foi determinar a viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* Shirota e *L. casei* Defensis incorporado à polpa das frutas manga, goiaba, acerola e cacau durante o armazenamento ( $-20^\circ\text{C}$ ), além de acompanhar o pH durante o período armazenamento. As amostras que apresentaram melhores resultados nas contagens de viabilidade foram ainda submetidas análise quanto a resistência a digestão gástrica e o impacto nas propriedades sensoriais das amostras com probiótico.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção das Polpas

As polpas de fruta pasteurizadas, dos sabores acerola, cacau, goiaba e manga utilizadas neste estudo foram adquiridas no comércio de Salvador-BA. Os sabores das polpas foram escolhidos aleatoriamente, sendo as mesmas adquiridas e usadas na semana da aquisição.

### 2.2. Cepas

Foram utilizadas as cepas *Lactobacillus acidophilus* Howaru® (DANISCO), *Lactobacillus plantarum* 299v® (ProViva), *Lactobacillus casei* Shirota® (Leite fermentado, Yakult), *Lactobacillus casei* Defensis® (Actimel, Danone), as duas últimas cepas isoladas dos produtos comerciais. As culturas congeladas (-20°C) foram reativadas três vezes em caldo MRS (MERCK) (18 h, 37°C, aerobiose), lavadas duas vezes e ressuspensas em solução salina fosfato tamponada (PBS), pH 7,2, sendo por fim, separadamente, incorporadas às polpas de fruta.

### 2.3. Preparação das Polpas de Frutas Congeladas com Probióticos

As combinações usadas neste estudo para produção de polpas de frutas congeladas com probiótico encontram-se na Tabela 1. Todos os diferentes sabores de polpas de fruta foram submetidos às mesmas combinações, algumas combinações tiveram o acréscimo de açúcar a 3%.

As polpas das variáveis com açúcar 3% foram previamente adicionadas de açúcar e homogeneizadas em liquidificador (modelo Astro mix, Faet) por 30 segundos, em seguida foi adicionada as culturas de *L. acidophilus* Howaru, *L. plantarum* 299v, *L. casei* Shirota e *L. casei* Defensis, respectivamente, sendo misturadas novamente em liquidificador por 20 segundos. As culturas das demais variáveis, sem açúcar 3%, foram diretamente homogeneizadas às polpas de fruta em liquidificador por 20 segundos. Imediatamente, as misturas de polpas de fruta foram divididas em porções de 10 mL, acondicionadas em sacos plásticos próprio para alimentos, previamente sanitizados em luz UV por 30 minutos, sendo submetidos ao congelamento a -80°C por 40 minutos e estocados a -20°C.

Também foram utilizadas soluções controle de sacarose 3% e leite desnatado 20%, em cada uma foi acrescentado separadamente, os microrganismos probióticos utilizados no presente estudo.

### 2.1. Análise da Viabilidade dos Microrganismos Probióticos em Polpas de Frutas

Para determinação da população probiótica foram utilizadas as polpas com probiótico antes do congelamento, e após um, sete, 14 e 28 dias de congelamento, sendo também avaliadas após aproximadamente 2, 3, 6 e 11 meses (56, 84, 168 e 308 dias, respectivamente). Para cada dia de amostragem foram retiradas porção de 10 mL. As amostras foram diluídas em 90 mL de água peptonada (1.0 g/L), misturado em liquidificador (modelo Astro

mix, Faet) por 20 segundos, seguindo para diluição seriada usando o mesmo diluente.

A contagem das células probióticas foi realizada pela técnica de espalhamento em superfície da placa utilizando 0,1 mL de cada diluição seriada em Agar MRS (MERCK), feito em duplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/72h, em condições aeróbias. A confirmação da célula foi feita pelo teste de catalase e por observação microscópica (1000x).

### **3.4. Determinação de pH**

Os valores de pH das polpas foram mensurados pela leitura direta em pH metro (KASVI), equipado com eletrodo de penetração (IonLab), antes da incorporação com os microrganismos probióticos e nos tempos 1, 7, 14, 28, 56, 84, 168 e 308 dias após o congelamento.

### **3.5. Teste de Resistência a Digestão Gastrointestinal *in vitro***

Foram utilizadas neste teste apenas quatro combinações da amostra de polpa de frutas que apresentaram os melhores resultados no teste de viabilidade (C1, C2, C3 e C4), estando dentro da faixa de contagem mínima de células probióticas viáveis para que um produto seja considerado probiótico. As amostras as polpas com probiótico foram avaliadas com um dia e com aproximadamente seis meses (168 dias) após o congelamento -20°C.

Para avaliação da resistência gastrointestinal foram utilizados 10 mL da amostra de polpa de fruta contendo probiótico misturada ao mesmo volume de solução salivar-gástrica, composta por CaCl<sub>2</sub> (0,22 g/L), NaCl (16,2 g/L), KCl (2,2 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (1,2 g/L) e pepsina suína 0,3%. Imediatamente após a mistura foi retirado um mL da amostra para diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) e feita a contagem das células viáveis utilizando o Ágar MRS, depois o pH foi reduzido a 2,5 com HCl, simulando as condições ácidas do estômago, e a amostra incubada a 37°C por 90 minutos. A cada 30 minutos alíquotas de um mL foram retiradas para diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) em água peptonada (1.0 g/L) e contagem das células viáveis em Ágar MRS. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/72h, em condições aeróbias.

Passado o período de incubação, alíquotas de 1,5 mL da amostra foram transferidas para dois microtubos. Em um dos microtubos a amostra foi centrifugada e lavada duas vezes com tampão PBS pH 7,4. Em seguida, o pellet de células foi ressuscitado em 1,5 mL de solução de bile 1%, simulando a entrada no duodeno, incubado em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Desse mesmo microtubo, foi retirado um mL da suspensão para diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) em água peptonada (1.0 g/L) e contagem das células viáveis em Ágar MRS.

O conteúdo do segundo microtubo contendo 1,5 mL da amostra foi centrifugado e, após descartado o sobrenadante, o pellet foi lavado por duas vezes com PBS pH 8,0. Posteriormente o pellet de células foi ressuscitado em solução de bile 0,3% e pancreatina 0,1% e, após incubação a 37°C por 90 minutos, foi retirado um mL da suspensão para diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) em água peptonada (1.0 g/L) e contagem das células viáveis em Ágar MRS. As

placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/72h, em condições aeróbias.

### **3.6. Análise Sensorial**

Os testes de análise sensorial foram realizados em cabines individuais no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Análises Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – campus Ondina, sendo utilizados apenas as amostras que estiverem dentro da faixa de contagem mínima de células probióticas viáveis para que um produto seja considerado probiótico. Este estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (CAAE 67008517.4.0000.8035).

Foi realizado um teste triangular que serve para identificar pequenas diferenças entre as amostras. Foram oferecidos ao avaliador três amostras, duas amostras iguais (polpa sem probiótico) e uma diferente (amostra com probiótico), o avaliador identificou qual das amostras era diferente. Para este teste foram recrutados 40 avaliadores ( $P_d = 40\%$ ,  $\alpha = 0,05$ ,  $\beta = 0,05$ ), não treinados entre alunos, professores e funcionários da UFBA.

Todas as amostras foram previamente analisadas quanto os padrões de qualidade higiênico-sanitária (ANVISA, 2001). No momento da análise foram diluídas em água potável na proporção 1:2, homogeneizadas em liquidificador, sendo apresentadas aos provadores na quantidade de 30 mL cada, servidos em copos plásticos, codificadas e previamente balanceadas. Sendo avaliados apenas os sucos elaborados a partir de polpas de frutas contendo *L. acidophilus* e *L. plantarum*, separadamente.

### **3.7. Análise dos Dados**

A análise de viabilidade e determinação de pH foram realizadas em duplicata. O analisis ANOVA foi feito, seguido do test *pos hoc* de Dunet, utilizando o software SPSS versão 15.0, para as análises de viabilidade. Os dados foram considerados significativos, tanto para as análises de viabilidade quanto para as análises sensoriais, quando o valor do p foi  $< 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção da polpa de manga com e sem açúcar e a solução controle de leite 20% que manteve as contagens de células viáveis elevadas ao longo do período de estocagem, nas demais polpas analisadas (cacau, acerola e goiaba) a diminuição foi gradativa e significativa ( $p < 0.05$ ) ao longo do período de estocagem. Nos tempos de um, sete e 56 dias, respectivamente, essas polpas apresentaram (Figura 1 – 4) baixas contagens de células, o que pode comprometer a capacidade do microrganismo em promover benefícios a quem os consome. Para que um produto tenha alegação probiótica é necessário que na porção consumida o conteúdo total de probióticos seja de  $10^8$  e  $10^9$  UFC, o que aconteceu na polpa de manga em todos os tempos se considerado o ingestão de 100g do produto nas quatro cepas utilizadas nesse estudo (SAAD, 2006; ANVISA, 2008; TRIPATHI; GIRI, 2014).

O nível inicial médio do *L. acidophilus* Howaru® foi de ordem de 8,85 log (UFC.mL<sup>-1</sup>), e ao final do período avaliado foi na ordem de 8,18, 8,51 e 8,06 log (UFC.mL<sup>-1</sup>) no leite 20% ( $p = 0.002$ ), manga ( $p = 0.065$ ) ou manga com açúcar ( $p = 0.001$ ), respectivamente. Não houve diferenças significativas na polpa de manga sem açúcar, mesmo assim os níveis nas outras matrizes alimentares foram satisfatórios durante o armazenamento (FIGURA 1).

O nível inicial médio do *L. plantarum* 299v® foi de ordem de 8,86 log (UFC.mL<sup>-1</sup>), e no final do período avaliado foi na ordem de 7,89, 7,74 e 7,57log (UFC.mL<sup>-1</sup>) no leite 20% ( $p = 0.001$ ), manga ( $p = 0.010$ ) ou manga com açúcar ( $p = 0.001$ ), respectivamente. Houve diferenças significativas nessas três matrizes alimentares, mesmo assim os níveis permaneceram satisfatórios para que o produto seja considerado funcional (FIGURA 2).

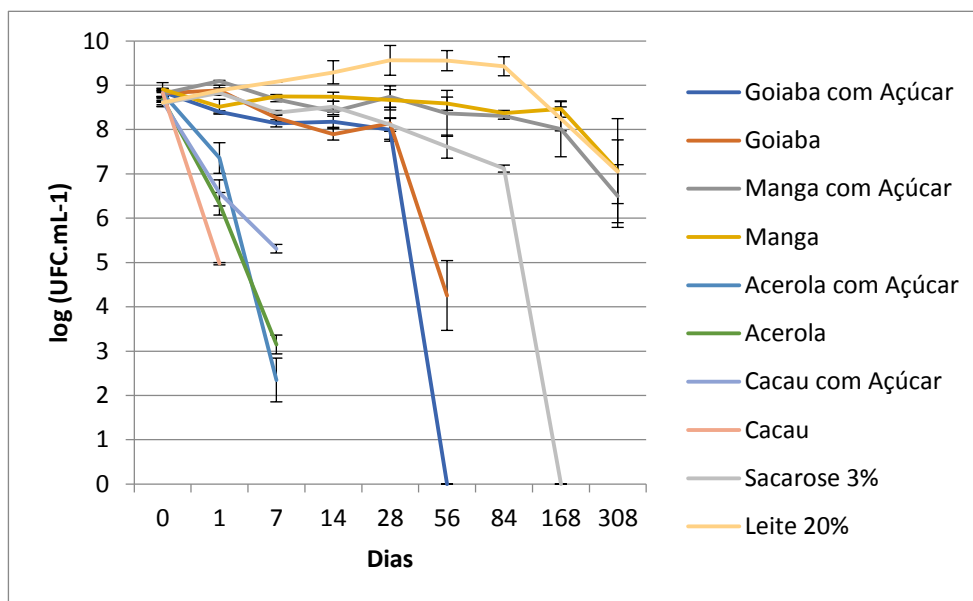
O nível inicial médio do *L. casei* Shirota® foi de ordem de 8,29 log (UFC.mL<sup>-1</sup>), e no final do período avaliado foi na ordem de 7,49, 7,99 e 7,62 log (UFC.mL<sup>-1</sup>) no leite 20% ( $p = 0.001$ ), manga ( $p = 0.137$ ) ou manga com açúcar ( $p = 0.004$ ), respectivamente. Não houve diferenças significativas na polpa de manga sem açúcar, mesmo que os níveis nas outras matrizes alimentares sejam significativamente menores, estes foram satisfatórios do ponto de vista da viabilidade (FIGURA 3).

Finalmente, o nível inicial médio do *L. casei* Defensis® foi na ordem de 8,25 log (UFC.mL<sup>-1</sup>), e no final do período avaliado foi na ordem de 7,14, 8,01 e 7,63 log (UFC.mL<sup>-1</sup>) no leite 20% ( $p = 0.001$ ), manga ( $p = 0.275$ ) ou manga com açúcar ( $p = 0.074$ ), respectivamente. Não houve diferenças significativas na polpa de manga com ou sem açúcar, mesmo que os níveis no leite tenham sido significativamente menores, mas também satisfatórios em quantidades suficientes que promova benefícios a quem os consomem (FIGURA 4).

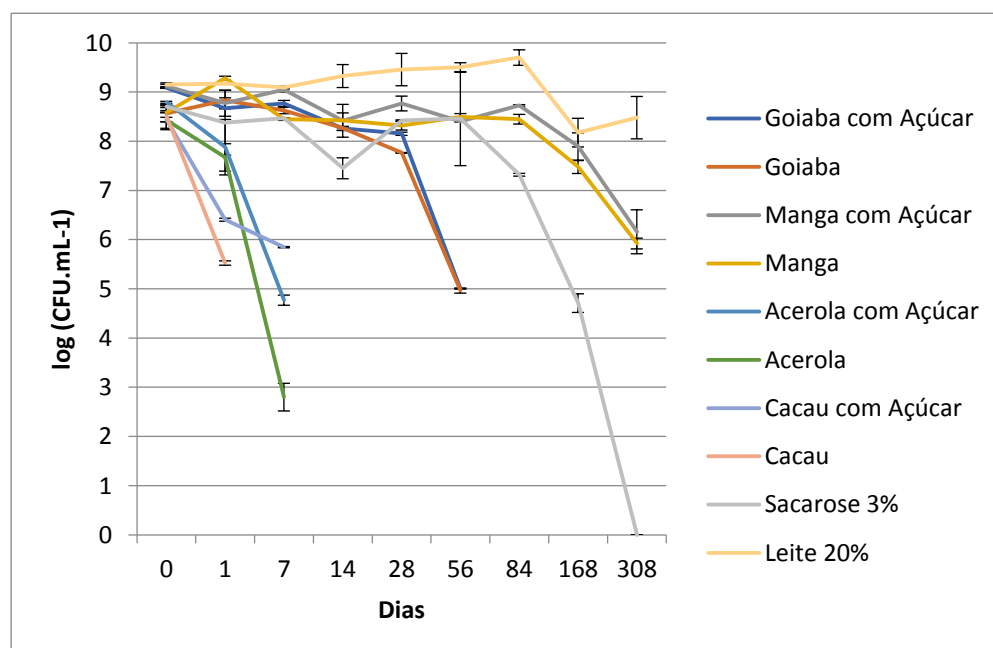
Fatores como acidez (pH), a presença de aditivos, conservantes e outros compostos potencialmente antimicrobianos característicos do próprio alimento, além das condições de processamento tecnológico e armazenamento são alguns fatores limitantes da sobrevivência do microrganismo probiótico nos alimentos, sendo um fator que causa o decréscimo no número de células probióticas no alimento e devem ser levados em conta na fabricação de um novo produto probiótico (VINDEROLA et al., 2002; CHAMPGNE et al., 2011; SHORI, 2016). Considerando que as amostras foram submetidas às mesmas condições tecnológicas de processamento e armazenamento do produto

desenvolvido, a composição de cada fruta pode ser apontada como fator principal na diferença da viabilidade apresentada por cada uma das frutas.

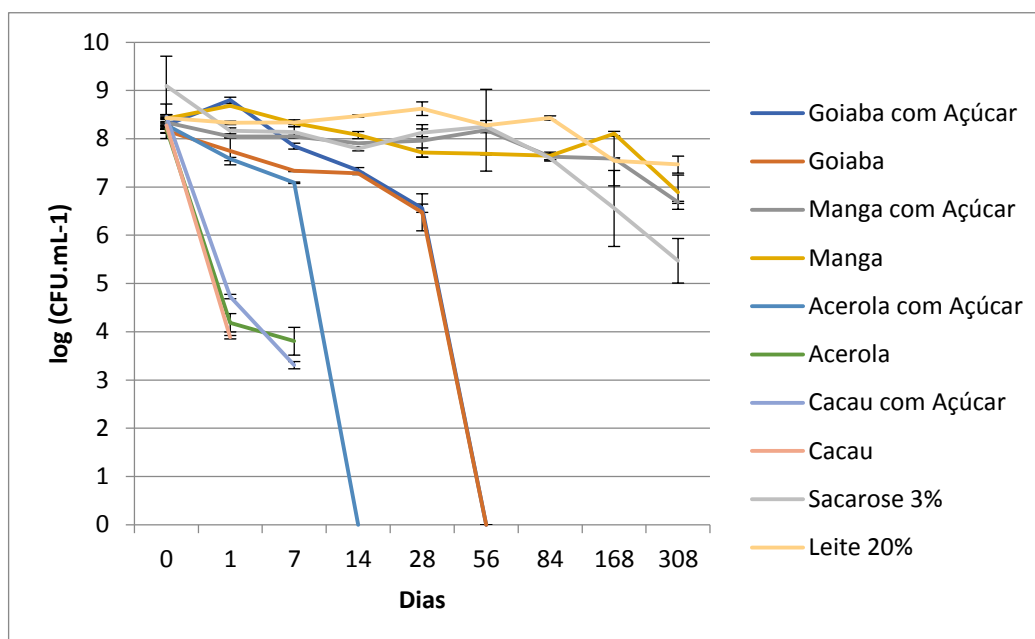
Sabendo que as características do alimento podem comprometer a viabilidade do alimento, a composição da fruta e seu comportamento na inibição de microrganismos devem ser cuidadosamente estudados, afim de que esta composição não atue inibindo o crescimento desejável de microrganismos probióticos. As frutas são consideradas uma categoria de alimentos muito heterogênea quanto a composição química, o que torna a sobrevivência das cepas muito variável (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007; CRUZ et al., 2009; TRIPATHI; GIRI, 2014).



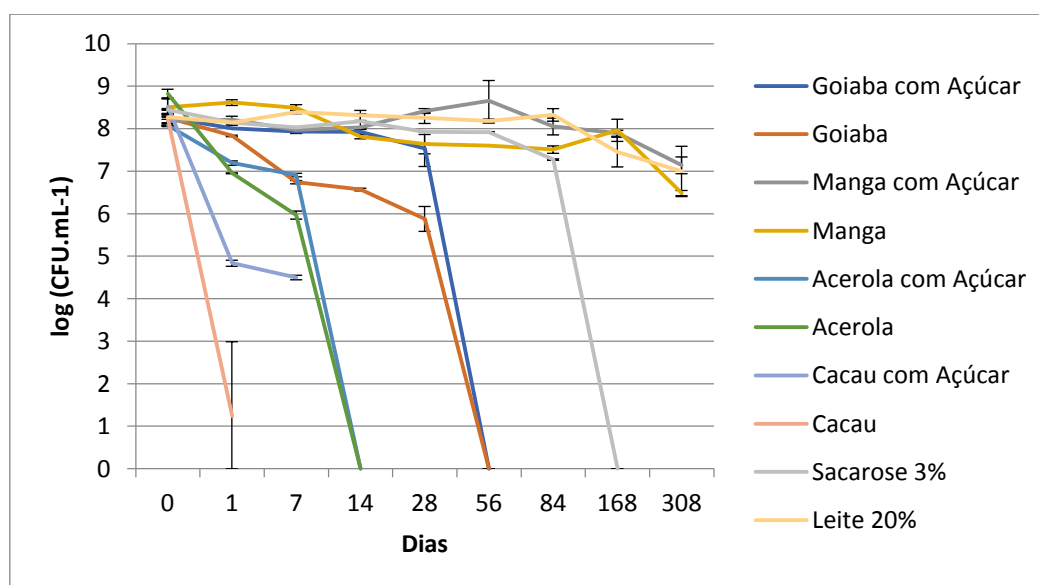
**Figura 1.** Viabilidade ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) do *Lactobacillus acidophilus* Howaru® em polpas de frutas durante a estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média ( $n=2$ ).



**Figura 2.** Viabilidade ( $\log \text{CFU.mL}^{-1}$ ) do *Lactobacillus plantarum* 299v® em polpas de frutas durante a estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média ( $n=2$ ).



**Figura 3.** Viabilidade ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) do *Lactobacillus casei* Shirota® em polpas de frutas durante a estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média ( $n=2$ ).



**Figura 4.** Viabilidade ( $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) do *Lactobacillus casei* Defensis® em polpas de frutas durante a estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 336 dias (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média ( $n=2$ ).

Segundo Céspedes e colaboradores (2013) a estabilidade probiótica de um determinado produto alimentar é uma característica individual e específica daquele produto. Corroborando com os resultados apresentados neste estudo, onde cada uma das quatro variedades testadas apresentou diferentes resultados no teste de viabilidade.

Este estudo demonstra que é possível disponibilizar no mercado mais um alimento probiótico a base de frutas, fazendo uma correta seleção da cepa e da fruta. Corroborando com outras pesquisas desenvolvidas nesta linha. Martins e colaboradores (2016) avaliaram o potencial da salada de frutas como

veiculador de *L. rhamnosus* HN001 constatando que as frutas minimamente processadas obtiveram contagem de probióticos similares aos valores encontrados em fermentados lácteos, constatando uma alta aderência das células probióticas ao tecido das frutas tais como abacaxi, manga e, principalmente, banana, goiaba e maçã.

Vasconcelos et al. (2014) desenvolveram um *mix* de açaí contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, com e sem inulina, conservado a -18°C e observaram contagens iniciais de células viáveis de 6,11 log UFC/g nas duas culturas em ambos os *mixes*. Céspedes et al. (2013), avaliando o desempenho de *L. casei*, normalmente empregadas em produtos lácteos, em bebidas não lácteos refrigeradas concluíram que as culturas probióticas comerciais podem ser adicionadas em sucos de frutas desde que haja cuidado com a seleção do produto específico, que garantam a viabilidade da célula, seus estudos comprovaram também que incorporadas nessas matrizes as células se mantiveram viáveis nos testes de simulação da digestão gástrica.

Nagpal, Kumar e Kumar (2012), demonstraram que as culturas de *L. acidophilus* e *L. plantarum* são capazes de sobreviver em suco de tomate, laranja e uva por até 72h em condições de alta acidez e baixo pH, validando o uso de suco de frutas como veículo ideal para os probióticos. Santos et al. (2008) ao desenvolverem suco de frutas com adição de 10<sup>8</sup> UFC/mL de *L. acidophilus* e 10% de oligofrutose, incubado a 8°C por 8 dias, obtiveram contagem mínima necessária para ser considerado um produto probiótico.

As cepas *L. acidophilus* Howaru, *L. casei* Shirota e Defensis, não tiveram diferenças significativas na polpa de manga sem açúcar. A presença do açúcar no congelamento pode ser um ingrediente protetor dependendo da velocidade de congelamento (fator não controlado neste estudo).

A sacarose quando incorporados ao produto é capazes de amenizar os efeitos da pressão osmótica sofrida pela células bacterianas durante o processamento e descongelamento (SAARELA et al., 2006; SCHMIDT; PEREIRA, 2011; THRIPATHI; GIRI, 2014), porém nesta pesquisa a presença de sacarose não foi importante para a sobrevivência das células probióticas. Ao contrário do esperado, no caso das cepas *L. acidophilus* Howaru, *L. casei* Shirota e Defensis na sua presença alcançaram valores menores.

Os valores de pH permaneceram constantes durante o período de armazenamento, como demonstrado na Tabela 1. Este parâmetro indica a eficiência do congelamento, o resultado indica que o congelamento rápido foi eficaz, de forma que os solutos foram aprisionados pelos cristais de gelo em formação promovendo uma maior dispersão dos solutos na fase não congelada. De acordo com Vasconcelos e colaboradores (2014) a redução na concentração de solutos, resulta na diminuição da força iônica e consequente menores variações nos valores de pH.

Dos tantos fatores intrínsecos da fruta atrelados a sua composição, que podem influenciar na viabilidade das culturas probióticas, uma das principais limitações para incorporação dos microrganismos probióticos é o pH baixo das frutas. (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007; CRUZ et al., 2009; TRIPATHI; GIRI, 2014). Entre as frutas testadas neste estudo a manga se destacou pois, além de ter um alto teor de carboidratos e fibras dietéticas na sua composição (RIBEIRO et al., 2008; JAHURUL et al., 2015), esta também apresentou os valores de pH mais elevados quando comparadas as demais frutas testadas.



As bactérias do gênero *Lactobacillus* são consideradas mais adequadas a utilização em frutas por serem mais resistentes ao pH baixo e possuírem maior adaptação aos alimentos, sendo tecnologicamente mais adequados para este fim (SILVA et al, 2010; ARGYRI et al., 2013; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Apesar de a viabilidade ser mantida em log na ordem de 8 – 7, durante a simulação à digestão gastrointestinal nas polpas de manga com probiótico houve uma redução de até seis ciclos log nas amostras avaliadas após um dia de congelamentos em três das quatro combinações analisadas, apenas a combinação C6 apresentou redução de quatro ciclos log (Figura 5). Na avaliação após seis meses houve uma redução ainda maior, as amostras deixaram de apresentar resistência ao pH ácido do estômago, acontecendo morte celular completa em todas as amostras, como demonstrado na Figura 6, indicando que a resistência gastrointestinal pode mudar ao longo da vida de prateleira do produto.

Diferente desse estudo, Céspedes e colaboradores (2013) observaram um aumento gradual da resistência gástrica *in vitro* das células de *L. casei* LC-01 e BGP 93 incorporadas em diferentes sabores de suco de frutas estocada a 5 e 20° C durante 28 dias, sendo que os melhores resultados para simulação gástrica foram alcançados pelo suco de pêsego armazenado a 20°C no vigésimo oitavo dia. Esses autores ainda afirmam que os testes gástricos *in vitro* são úteis para avaliar impactos dos fatores tecnológicos, armazenamento ou da matriz alimentar, esta resistência pode mudar ao longo do tempo de armazenamento e da composição da matriz alimentar, podendo ainda haver discrepâncias entre os ensaios digestão gástrica *in vivo* e *in vitro*.

Pesquisa realizada por Vinderola e colaboradores (2011) demonstrou diferentes resultados para simulação da resistência gástrica *in vitro* em leites fermentados com *L. casei* de sabores, tempo e temperatura (5 e 20° C) de armazenamento variados, em que os leites fermentados apesar de manterem a viabilidade celular probiótica em níveis aceitáveis durante o armazenamento, notaram uma diminuição da resistência celular a acidez gástrica ao longo do tempo de armazenamento.

Estudo realizado por Saarela e colaboradores (2006) relatou uma redução progressiva da resistência gástrica simulada em sucos de frutas contendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* mantidas em temperaturas de 4 e 20° C por 6 semanas.

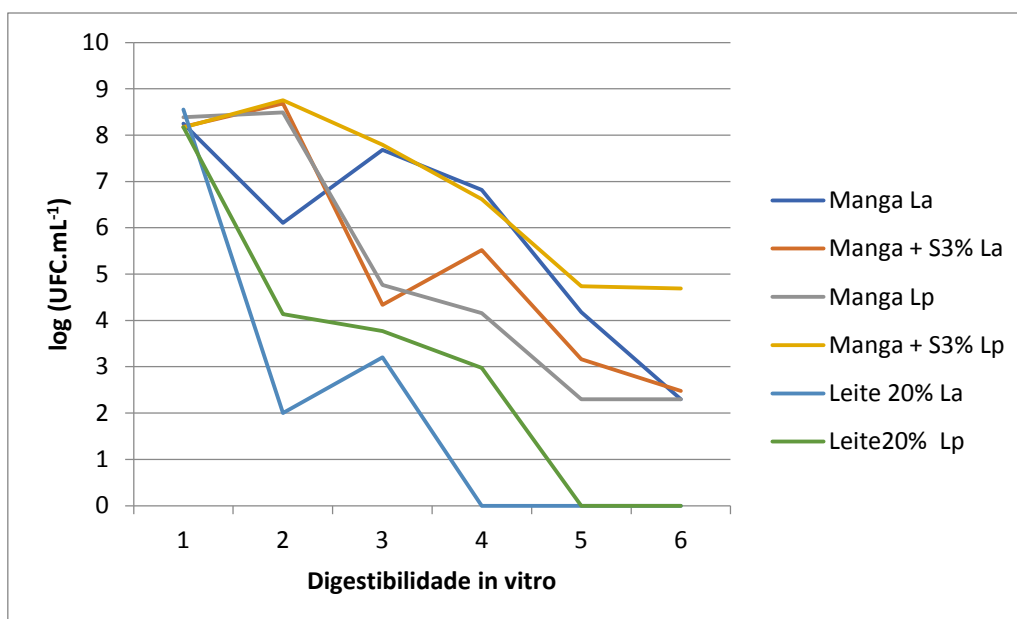
Como neste estudo para polpa de manga e em todos os citados não houve redução significativa na viabilidade das células ao longo do armazenamento, como foi observado na polpa de manga incorporada com as células probióticas, no entanto percebe-se que ao longo do armazenamento ocorreu uma diminuição na resistência celular a acidez gástrica simulada, o que acarretaria numa provável perda da funcionalidade dessas células em questão.

Tanto nos testes de viabilidade quanto nos testes de resistência gástrica a amostra de leite a 20% obteve melhores resultados do que a do suco. Resultado já esperado uma vez que o leite possui todas as características desejáveis para uma boa matriz alimentar, sendo o pH próximo a neutralidade, uma das principais características favoráveis (SAARELA, 2006; ANTUNES et al., 2013; BURNS et al., 2014).

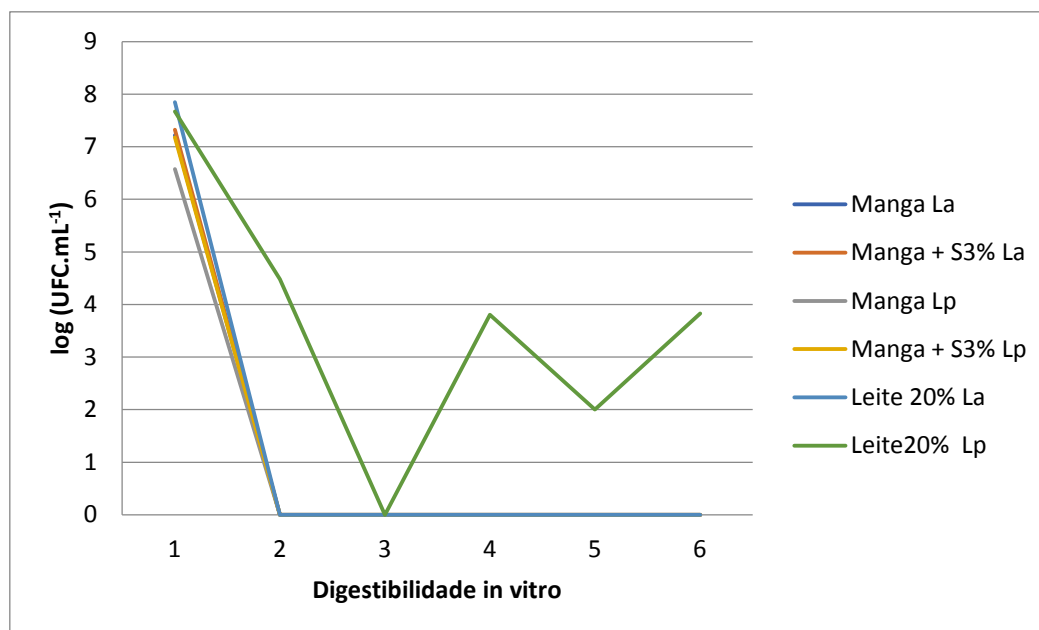
**Tabela 1.** Evolução do pH nas diferentes combinações de polpas de frutas e culturas probióticas durante a estocagem a -20 °C por 336 dias.

Cultura	Amostra	Tempo de Estocagem (dias)								
		0	1	7	14	28	56	84	168	308
<i>L. acidophilus</i>	Manga S3%	4,21±0,01	4,27±0,02	4,26±0,02	4,22±0,02	4,24±0,00	4,08±0,03	4,10±0,01	4,00±0,00	4,20±0,01
	Manga	4,25±0,00	4,22±0,02	4,33±0,00	4,27±0,01	4,29±0,03	4,09±0,03	4,20±0,08	4,02±0,03	4,19±0,01
	Goiaba S3%	4,00±0,00	3,94±0,01	3,90±0,01	4,08±0,01	3,79±0,05	3,75±0,07	3,76±0,03	NR	NR
	Goiaba	3,90±0,00	3,91±0,01	3,95±0,01	4,07±0,01	3,76±0,03	3,78±0,04	3,80±0,02	NR	NR
	Acerola S3%	3,79±0,01	3,80±0,05	3,82±0,03	3,69±0,00	3,48±0,06	NR	NR	NR	NR
	Acerola	3,72±0,01	3,70±0,00	3,77±0,01	3,71±0,04	3,49±0,04	NR	NR	NR	NR
	Cacau S3%	3,86±0,03	4,02±0,01	3,91±0,02	3,79±0,04	3,59±0,01	NR	NR	NR	NR
	Cacau	3,87±0,00	4,02±0,01	3,87±0,01	3,84±0,01	3,48±0,01	NR	NR	NR	NR
	Sacrose 3%	7,03±0,02	7,21±0,01	7,28±0,05	7,21±0,03	6,86±0,01	7,34±0,09	7,19±0,01	7,10±0,03	7,38±0,08
	Leite 20%	6,94±0,01	6,93±0,01	7,02±0,06	6,99±0,03	6,62±0,01	6,64±0,03	6,79±0,01	6,92±0,06	6,80±0,04
<i>L. plantarum</i>	Manga S3%	4,25±0,01	4,27±0,01	4,32±0,01	4,27±0,01	4,27±0,02	4,14±0,02	4,10±0,06	4,02±0,00	4,24±0,01
	Manga	4,17±0,01	4,21±0,01	4,32±0,01	4,27±0,01	4,25±0,04	4,12±0,04	4,09±0,01	3,98±0,02	4,20±0,01
	Goiaba S3%	3,92±0,01	3,95±0,01	3,94±0,00	4,08±0,01	3,80±0,01	3,83±0,05	3,77±0,02	NR	NR
	Goiaba	3,95±0,01	3,93±0,01	3,98±0,00	4,07±0,01	3,80±0,02	3,83±0,01	3,85±0,02	NR	NR
	Acerola S3%	3,74±0,01	3,72±0,01	3,77±0,01	3,67±0,01	3,43±0,09	NR	NR	NR	NR
	Acerola	3,70±0,01	3,73±0,02	3,83±0,01	3,69±0,01	3,54±0,00	NR	NR	NR	NR
	Cacau S3%	3,96±0,01	4,02±0,01	3,89±0,01	3,80±0,05	3,62±0,02	NR	NR	NR	NR
	Cacau	3,91±0,00	4,04±0,01	3,88±0,01	3,86±0,00	3,48±0,05	NR	NR	NR	NR
	Sacrose 3%	7,06±0,01	7,15±0,00	7,22±0,11	7,18±0,08	6,90±0,01	7,04±0,01	7,45±0,10	7,03±0,02	7,12±0,12
	Leite 20%	6,90±0,01	6,95±0,00	7,03±0,08	6,98±0,01	6,64±0,00	6,69±0,04	6,74±0,01	6,87±0,01	6,88±0,01
<i>L. casei Shirota</i>	Manga S3%/	4,24±0,01	4,26±0,01	4,30±0,02	4,26±0,01	4,24±0,02	4,17±0,03	4,06±0,04	4,00±0,01	4,22±0,01
	Manga	4,20±0,00	4,19±0,01	4,29±0,01	4,24±0,01	4,20±0,02	4,06±0,03	4,04±0,04	3,95±0,01	4,18±0,02
	Goiaba S3%	3,99±0,01	3,94±0,01	3,95±0,01	4,08±0,01	3,75±0,05	3,84±0,05	3,80±0,01	NR	NR
	Goiaba	3,95±0,01	3,93±0,01	3,96±0,01	4,05±0,01	3,81±0,03	3,82±0,00	3,78±0,02	NR	NR
	Acerola S3%	3,74±0,01	3,72±0,01	3,79±0,01	3,66±0,00	3,43±0,04	NR	NR	NR	NR
	Acerola	3,70±0,00	3,69±0,01	3,81±0,01	3,67±0,01	3,54±0,05	NR	NR	NR	NR
	Cacau S3%	3,98±0,01	4,03±0,00	3,90±0,01	3,85±0,01	3,59±0,02	NR	NR	NR	NR
	Cacau	3,92±0,00	4,00±0,01	3,87±0,01	3,84±0,01	3,53±0,00	NR	NR	NR	NR
	Sacrose 3%	7,39±0,01	7,43±0,01	7,52±0,06	7,40±0,02	7,20±0,02	7,28±0,02	7,47±0,01	7,26±0,01	7,46±0,07
	Leite 20%	6,93±0,01	7,04±0,01	7,06±0,04	7,02±0,02	6,66±0,01	6,73±0,01	6,77±0,02	6,88±0,02	6,91±0,00
<i>L. casei defensis</i>	Manga S3%	4,17±0,01	4,22±0,01	4,29±0,01	4,23±0,01	4,22±0,01	4,10±0,02	4,02±0,04	3,95±0,01	4,21±0,00
	Manga	4,23±0,02	4,24±0,01	4,36±0,00	4,29±0,00	4,29±0,01	4,13±0,04	4,11±0,02	4,04±0,00	4,22±0,01
	Goiaba S3%	4,01±0,00	3,94±0,01	3,91±0,01	4,08±0,00	3,73±0,04	3,68±0,00	3,76±0,06	NR	NR
	Goiaba	3,91±0,05	3,95±0,01	3,97±0,02	4,08±0,01	3,80±0,02	3,83±0,00	3,75±0,09	NR	NR
	Acerola S3%	3,69±0,01	3,68±0,02	3,78±0,02	3,67±0,01	3,36±0,04	NR	NR	NR	NR
	Acerola	3,72±0,01	3,72±0,00	3,80±0,01	3,65±0,01	3,55±0,01	NR	NR	NR	NR
	Cacau S3%	3,97±0,00	4,03±0,02	3,89±0,01	3,85±0,00	3,62±0,00	NR	NR	NR	NR
	Cacau	3,36±0,00	4,06±0,01	3,88±0,01	3,83±0,01	3,47±0,01	NR	NR	NR	NR
	Sacrose 3%	6,68±0,01	7,14±0,01	7,31±0,21	7,24±0,09	6,66±0,07	6,84±0,15	7,20±0,00	6,80±0,06	6,92±0,07
	Leite 20%	6,95±0,01	6,95±0,01	7,06±0,05	7,02±0,02	6,65±0,01	6,76±0,02	6,79±0,01	6,87±0,01	6,88±0,01

(NR: Não realizado)



**Figura 5.** Viabilidade (log UFC.mL<sup>-1</sup>) na resistência a digestão gástrica simulada (1- solução salivar; 2- 30 minutos pH 2,5; 3- 60 minutos pH 2,5; 4- 90 minutos pH 2,5; 5- solução bile; 6- solução bile+pancreatina) em polpas de manga e leite com *L. acidophilus* (La) e *L. plantarum* (Lp) durante a estocagem a -20 °C por após **um dia** de congelamento (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).



**Figura 6.** Viabilidade (log UFC.mL<sup>-1</sup>) na resistência a digestão gástrica simulada (1- solução salivar; 2- 30 minutos pH 2,5; 3- 60 minutos pH 2,5; 4- 90 minutos pH 2,5; 5- solução bile; 6- solução bile+pancreatina) em polpas de manga e leite com *L. acidophilus* (La) e *L. plantarum* (Lp) durante a estocagem a -20 °C por após **168 dias** (~06 meses) de congelamento (S3% - com sacarose 3%). Os valores representam uma média (n=2).

Na análise sensorial os avaliadores, apesar de descreverem dificuldade na avaliação, detectaram diferença nas características sensoriais entre as amostras polpas de manga com *L. acidophilus* e as amostras padrão sem

probióticos. Já as amostras de polpa de manga com *L. plantarum* demonstraram similaridade estatisticamente significativa entre as amostras com e sem o probiótico (Tabela 3). Neste trabalho, as amostras utilizadas possuíam inóculo inicial elevado, no caso da polpa com *L. acidophilus* (quase na ordem de  $0 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Tendo em vista que já foi reportado que um inóculo inicial dessa espécie pode afetar negativamente as propriedades sensoriais (OLSON; ARYANA, 2008) e o fato que esta cepa manteve uma alta viabilidade, o inóculo dela poderia ser reduzido em uma ordem logarítmica, atingindo assim valores de células viáveis ainda adequados para o produto ser considerado probiótico e muito provavelmente já não sendo percebido sensorialmente.

Sabe-se que a análise sensorial permite observar quais características dos alimentos são mais afetadas quando se acrescenta o probiótico. Manter as características sensoriais do alimento convencional após o acréscimo do ingrediente que o torna funcional é uma característica fundamental para a aceitação pelo consumidor, já que o sabor é o principal motivador para seleção do alimento, seguido pelo benefício à saúde, ter uma boa aceitação sensorial é muito importante para inserção de um novo produto no mercado (SIRÓ et al., 2008; CRUZ et al., 2009; GRANATO et al., 2010).

**Tabela 2.** Resultado do teste sensorial triangular para detecção de diferença sensorial nas combinações de polpas de mangas com culturas probióticas ( $p < 0,05$ ).

	Acertos	Erros	Total de Avaliadores
<i>L. acidophilus</i>	26	14	40
<i>L. plantarum</i>	14	26	40

## 5. CONCLUSÃO

Constatou-se com este estudo que nem todas as polpas de frutas podem ser consideradas boas como matrizes alimentares para a incorporação de microrganismos probióticos, sendo que neste estudo apenas a polpa de manga sem açúcar demonstrou contagem de células viáveis aceitáveis durante todo o período de armazenamento avaliado, sem diferenças significativas quanto ao conteúdo inicial de células viáveis, para 3 das 4 cepas avaliadas. Verificou-se que o acréscimo da sacarose não foi positivo para viabilidade das células probióticas. Quanto os valores de pH estes foram constantes durante o armazenamento das polpas. Houve um decréscimo ao longo do período de armazenamento nas contagens de células após a simulação gastrointestinal *in vitro*. Sensorialmente os avaliadores não detectaram modificações em polpa de manga incorporadas com *L. plantarum*, o que deixa esta combinação em vantagem sobre o *L. acidophilus*, mesmo assim alternativas tecnológicas, como a diminuição do nível inicial da cepa, neste caso podem levar ao consumidor um produto com altos níveis de células viáveis, mais sem prejuízo às propriedades sensoriais.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, A.E.C.; LESERRE, A.M.; COELHO, A.L.A.; MENEZES, C.R.; MORENO, I.; YOTSUYANAGI, K.; AZAMBUJA, N.C. Acerola nectar with added microincasulated probiotic. **LWT – Food Science and Technology**. v. 54, p. 125-131, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 12 de 02 janeiro de 2001. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos**. Brasília, 2001.

ANVISA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. **Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Lista das alegações aprovadas em julho de 2008.

ARGYRI, A.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.A.G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.J.R.; PANAGO, E.Z.; TASSOU, C.C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* test. **Food Microbiology**. v. 33, p. 282-291, 2013.

BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 315-317, 2007.

BURNS, P.; LAFFERRIERE, L.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J. Influence of dairy practices on the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. **International Journal of Dairy Technology**. v. 67, n. 3, p. 448-457, 2014.

CÉSPEDES, M.; CÁRDENAS, P.; STAFFOLANI, M.; CIAPPINI, M. C.; VINDEROLA, G. Performance in nondairy drinks of probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products. **Journal of Food Science**. v. 78, n. 5, p. M756 – M762, 2013.

CHAMPGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and food matrices. **International Journal of Food Microbiology**. v, 149, p. 185 – 193, 2011.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Research International**. v. 42, p. 1233-1239, 2009.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2002.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risk and challenges. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, p. 284-292, 2013.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 9, p. 292-302, 2010.

JAHURUL, M.H.A.; ZAIDUL, I.S.M.; GHAFOR, K.; AL-JUHAIMI, F.Y.; NYAM, K.; NORULAINI, N.A.N.; SAHENA, F.; MOHD OMAR, A.K. Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: a review. **Food Chemistry**. v.183, p. 173-180, 2015.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**. v. 7, p. 58 – 63, 2016.

KUMAR, B.V.; VIJAYENDRA, S.V.; REDDY, O.V.S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. **Journal Food Science and Technology**. v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**. v. 15, p. 751 – 759, 2004.

MARTINS, E.M.F.; RAMOS, A.M.; MARTINS, M.L.; LEITE JÚNIOR, B.R.C. Fruit salad as a new vehicle for bacteria probiotic. **Food Science and Technology**. v. 36, n. 3, p. 540-548, 2016.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M. Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli. **Annals of Microbiology**. v. 62, p. 1573-1578, 2012.

OLSON, D.W.; ARYANA, K.J.. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. **LWT - Food Science and Technology**.v. 41, p. 911-918, 2008.

RIBEIRO, S.M.R.; BARBOSA, L.C.A.; QUEIROZ, J.H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**. v. 110, p. 620-626, 2008.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; ALAKOMI, H.L.; SIGVART-MATTILA, P.; MÄTTÖ, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1477 – 1482, 2006.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, p. 1 -14, 2006.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. Na overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**. v. 50, p. 1- 16, 2013.

SAHER, M.; ARVOLA, A.; LINDEMAN, M.; LAHTEENMAKI, L. Impressions of functional food consumers. **Appetite**, v. 42, p. 79–89, 2004.

SCHMIDT, L. F.; PEREIRA, K. S. O potencial dos probióticos e prebióticos em bebidas de origem vegetal. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011. cap. 23.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 1262 – 1277, 2007.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁLPONA, B.; LUGASI, A. Funtional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**. v. 51, p. 456 – 467, 2008.

SYBESMA, W.; KORT, R.; LEE, Y. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Tends in Biotechnology**. v. 33, n. 4, p. 197 – 200, 2015.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional foods**. v. 9, p. 225-241, 2014.

VASCONCELOS, B. G.; MARTINEZ, R. C. R.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Innovative açai (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science Biotechnology**. v. 23, n. 5, p. 1843 – 1849, 2014.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 579 – 589, 2002.

VINDEROLA, C. G.; CÉSPEDES, M.; MATEOLLI, D.; CÁRDENAS, P.; LESCANO, M.; AIMARETTI, N.; REINHEIMER, J. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks

during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**. v. 64, n. 2, p. 269 – 275, 2011.