

Produção e análises físico-químicas de bebida probiótica de suco de maracujá

Laís Fragali Machado¹
Márcia Luzia Rizzato²

Resumo: Os produtos probióticos contém microrganismos vivos que melhoram o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do consumidor. Os alimentos probióticos disponíveis são derivados de leite, limitando o consumo destes por indivíduos intolerantes à lactose e alergias ao leite. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver uma bebida probiótica a partir do suco de maracujá fermentado com *Lactobacillus casei*. Utilizou-se polpa de suco de maracujá com água mineral na proporção de 1:3, sem adição de açúcar. Foram realizados dois tipos de formulações, uma com suco de maracujá com pH original de 3,03 e outra com suco de maracujá com pH ajustado para 6,0. A fermentação foi feita a 30°C por 20 horas após a inoculação de *L. casei* (10^6 UFC mL⁻¹) nos sucos. A fermentação foi monitorada através de ensaios físico-químicos (pH, °Brix, biomassa e acidez), microbiológicos para contagem de *L. casei* e análises de viabilidade do *L. casei* ao longo do armazenamento a 4°C por 21 dias dos sucos de maracujá fermentados. O microrganismo probiótico avaliado ao final da fermentação e durante o armazenamento manteve viabilidade constante somente na formulação que teve o pH ajustado, apresentando 10^8 UFC mL⁻¹, sendo este número desejável para uma bebida probiótica.

Palavras-chave: *Lactobacillus casei*, Fermentação, Alimento funcional.

Abstract: Probiotic products contain live microorganisms that improve the intestinal microbial balance producing beneficial effects to the health of the consumer. The available probiotic foods are derived from milk, limiting their consumption by individuals intolerant to lactose and milk allergies. This work aimed to develop a probiotic drink from passion fruit juice fermented with *Lactobacillus casei*. Passion fruit juice pulp was used with 1: 3 mineral water, without added sugar. Two types of formulations were made, one with passion fruit juice with original pH of 3.03 and another with passion fruit juice with pH adjusted to 6.0. The fermentation was done at 30°C for 20 hours after inoculation of *L. casei* (10^6 CFU mL⁻¹) in the juices. The fermentation was monitored by physicochemical tests (pH, °Brix, biomass and acidity), microbiological for *L. casei* counts and viability analyzes of *L. casei* throughout the storage at 4 ° C for 21 days of fermented passion fruit juices. The probiotic microorganism evaluated at the end of the fermentation and during storage maintained constant viability only in the pH-adjusted formulation, presenting 10^8 CFU mL⁻¹, this number being desirable for a probiotic beverage.

Key words: *Lactobacillus casei*, Fermentation, Functional food.

¹ IFSP- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão; laisffmachado@gmail.com

² IFSP- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão; marciarizzato@gmail.com

Alimentos funcionais representam uma das tendências mais recentes para o mercado de alimentos, isso está associado ao interesse dos consumidores em ingerir alimentos que confirmem benefícios à saúde. Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os que possuem culturas probióticas, ou seja, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (COELHO, 2009).

Atualmente o principal veículo para os microrganismos probióticos são o leite e seus derivados, entretanto, o mercado global se desperta para o “desenvolvimento de bebidas funcionais baseadas em sucos de frutas fortificadas com ingredientes probióticos” (GRANATO et al., 2010, p.296), pois é solução alternativa às intolerâncias à lactose, alergias ao leite, à dieta vegetariana e ao colesterol que está presente em produtos lácteos (SCHMIDT; PEREIRA, 2011; YOON; WOODANS; HANG, 2005). Entre os microrganismos empregados para esta finalidade, destacam-se *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruecki*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e bifidobactérias (GRANATO et al., 2010; YOON, WOODAMS, HANG, 2004; YOON, WOODAMS e HANG, 2005).

O maracujá (*Passiflora edulis*) é originário da América Tropical, apresentando grande aceitação pelos consumidores principalmente na forma de suco concentrado (ITI TROPICALS, 2007). A fruta além de ser rica em vitaminas e minerais possui um preço bastante acessível para todos e é encontrado em todo o Brasil devido à extensão de área, clima privilegiado, relevo pouco acidentado e inúmeras outras características favoráveis ao desenvolvimento da cultura (MAARA, 1996).

Dessa forma, considerando a relevância dos alimentos funcionais na saúde humana, os benefícios ocasionados pela ingestão de microrganismos probióticos, conciliando com o consumo de suco de maracujá e que as fontes alimentares de probióticos ainda são muito limitadas aos produtos lácteos, é de fundamental importância que novas bebidas probióticas sejam pesquisadas, a fim não só de ampliar o mercado desses produtos, mas de servir como opção aos que não podem ou não apreciam o consumo de produtos lácteos.

Sendo assim, o atual trabalho consta em produzir um fermentado de maracujá probiótico, o qual será um produto novo no mercado, que poderá contribuir para o consumo de alimentos funcionais, uma vez que proporcionará uma potencial fonte de probióticos às pessoas que não consomem produtos lácteos.



Alimentos funcionais

O caráter funcional pode ser atribuído a uma qualidade inerente à matéria-prima ou a uma característica implementada, por meio de tecnologias de processamento inovadoras ou a adição de ingredientes promotores da saúde, tal como a adição de probióticos na matriz alimentar (BISTROM; NORDSTROM, 2002). As indústrias, simultaneamente, estão se esforçando para oferecer ao mercado consumidor produtos com essas inovações.

Os alimentos funcionais não constituem um grupo homogêneo, portanto, suas características não podem ser generalizadas, pois existem diferenças claras entre os diferentes produtos alimentícios ditos funcionais. Dentre os principais fatores que afetam a aceitabilidade e intenção de uso destes alimentos, destacam-se fatores demográficos (gênero, idade e nível educacional) e estilo de vida (URALA; LAHTEENMAKI, 2007).

Alimentos probióticos

A Resolução RDC nº 02 de janeiro de 2002 que aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com Alegação de Propriedade Funcional e ou de Saúde (APFS) define os probióticos e substâncias bioativas. Probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

As principais bactérias empregadas como suplementos em alimentos funcionais probióticos são as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (FUCHS et al., 2005). A quantidade mínima viável para os probióticos deve ser estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação (BRASIL, 2008).

Segundo os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001), para ser considerado probiótico, o produto deve conter no mínimo de 10^6 a 10^7 UFC/mL do microrganismo durante o prazo de validade do produto. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, fermentados lácteos probióticos devem apresentar no mínimo de 10^6 UFC/mL (BRASIL, 2008).

As bactérias probióticas mais pesquisadas são as do grupo das bactérias lácticas e seus gêneros incluem o *Lactobacillus*, o *Lactococcus*, o *Streptococcus*, alguns *Enterococcus* e também são representadas pelo gênero *Bifidobacterium* (FERNÁNDEZ et al., 2003).

Bactérias ácido lácticas - *Lactobacillus casei*

As bactérias ácido lácticas propiciam o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis e participam da preservação de diversos produtos submetidos à fermentação. E ainda são utilizados como probióticos, adjunto terapêutico, para humanos e animais (NASCIMENTO, 2008). Em particular, tem ocorrido o aumento na produção de leites fermentados com o grupo de *L. casei* (MÄYRÄ-MÄKINEN; BIGRET, 1998, VINDEROLA et al., 2000), possivelmente pelo seu sistema proteolítico que contribui para a liberação de peptídeos bioativos da matéria-prima (WOUTERS, 2002).

Efeitos benéficos dos probióticos

Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos são justificados pela competição por sítios de adesão formando uma barreira física contra agentes patogênicos (LAZADO et al., 2011), competição por nutrientes impedindo a colonização de outros microrganismos, inativação das toxinas e seus receptores e pela estimulação da fagocitose e das respostas imunológicas específicas e inespecíficas contra agentes patogênicos (SILVA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2005). Além da produção de substâncias antibacterianas, que tem ação bacteriostática ou bactericida em relação às bactérias patogênicas (LIMA et al., 2007).

Probióticos são capazes de modular algumas características fisiológicas do trato gastrointestinal, como a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal (BRANDT et al., 2006; SAAD, 2006). Vários fatores externos podem interferir na microbiota normal do nosso intestino, como a dieta, o uso de antibióticos, stress, fumo, tratamentos quimioterápicos e radioterapia, além do envelhecimento (SANTOS et al., 2008).

Pesquisa realizada por Costa et al. (2012) avaliou *in vitro* duas linhagens de lactobacilos e uma de bifidobactéria quanto a capacidade de inibição de microrganismos patogênicos envolvidos nas mais comuns toxinfecção alimentares e segundo o autor, a inibição dos agentes patogênicos ocorreu devido à produção de ácido láctico e acético, produzidos a partir da fermentação. A produção destes ácidos potencializa o efeito antimicrobiano e consequentemente o equilíbrio da microbiota intestinal.



Probióticos na indústria de alimentos

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Esse desempenho pode ser avaliado pela multiplicação no alimento, promoção de propriedades sensoriais adequadas no produto e estabilidade e viabilidade durante armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA et al., 2002).

Na produção de um alimento probiótico, é fundamental que a bactéria probiótica possa ser cultivada em escala industrial, sendo que o produto final deve ter vida média satisfatória, variando de 15 a 30 dias, e propriedades sensoriais – cor, aroma, sabor e textura – aceitáveis, com os microrganismos presentes no produto viáveis e em número elevado ($>10^6$ UFC mL⁻¹) durante a vida de prateleira (BRASIL, 2008).

Atualmente, os alimentos probióticos disponíveis no mercado incluem sobremesas à base de leite, leite fermentado, leite em pó, sorvete, iogurte e diversos tipos de queijo, além de produtos na forma de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, sucos fortificados, alimentos de origem vegetal fermentados e maioneses (SAAD, 2006).

Material e métodos

Substrato

O substrato utilizado foi a polpa de maracujá pasteurizada congelada, da marca Taeq®, obtida junto ao comércio local.

Microrganismo

Foram utilizadas as culturas probióticas liofilizadas de *L. casei*, obtidas junto ao comércio local.

Preparo do suco de maracujá

Foi utilizada polpa de maracujá sem adição de conservantes e de açúcar, diluído 1:3 (suco: água mineral). Foram feitas duas diferentes formulações do suco:

S₁ – Apenas suco;

S₂ – Suco pH ajustado 6,0. Adição de NaOH 5 M, em condições assépticas (KOUZEKI et al., 2013).



De acordo com a ANVISA (2007), o NaOH pode ser utilizado como aditivo alimentar segundo as Boas Práticas de Fabricação, com a função de regulador de acidez.

Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com 0,01g da cultura comercial liofilizada de *L. casei* e foi inoculada assepticamente em um Erlenmeyer com 100 mL de leite Molico UHT Desnatado (Nestlé) e 0,3% de extrato de levedura (Himedia) dentro de capela de fluxo laminar e incubado em estufa a 35°C por 48 horas. Foi transferido 1 mL da cultura originada do leite Molico em um Erlenmeyer contendo 100 mL de MRS caldo. O preparado foi mantido em estufa a 35°C por 24 horas (KOUZEKI et al., 2013).

Fermentação do suco de maracujá

Foi inoculada a alíquota de 0,1 mL do caldo MRS (item 4.2.2) com *L. casei* em ambas as formulações contendo 500 mL do suco diluído 1:3 num Erlenmeyer, correspondendo a um inóculo de $1,37 \times 10^6$ UFC/mL. A fermentação foi feita em duplicata por 20 horas a 30°C em incubadora (adaptação KOUZEKI, 2012; GOMES, 2006).

Análise da viabilidade do *L. casei* no suco fermentado

Foi realizada diluição seriada dos sucos de maracujá (nas duas diferentes formulações) em água peptonada estéril até se obter a diluição de 10^{-6} (adaptado de KOUZEKI et al., 2013; COELHO, 2009).

Análise do pH

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca MS TECNOPON® instrumentação, modelo mPA-210, calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme a AOAC (1995).

Determinação do crescimento microbiano durante a fermentação

A análise da biomassa foi determinada pelo método do peso úmido de acordo com NEVES, 2005.

Análise de °Brix

O °Brix foi determinado através de leitura direta em refratômetro de marca Hanna Instruments®, modelo HI 96801, inicialmente calibrado.

Análise de acidez total e acidez láctica

Determinou-se a acidez total através de titulação com NaOH 0,1 mol/L e fenolfetaleína de acordo com as normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008.



Análise de Vitamina C

A determinação da quantidade de vitamina C foi realizada por método volumétrico (iodometria), onde o ácido ascórbico (vitamina C) reduz rapidamente iodo a íon iodeto, formando o ácido deidroascórbico (FREITAS, 2013).

Análise sensorial do suco de maracujá probiótico

O suco de maracujá fermentado probiótico submetido à análise foi elaborado com água mineral nas condições ótimas de fermentação e acondicionado em Erlenmeyers de vidro. O produto foi fermentado por 20 horas a 30°C e após a fermentação, os Erlenmeyers contendo o suco foram imersos em banho de gelo e armazenados sob refrigeração até o momento da análise sensorial. Nos sucos adoçados, a adição do edulcorante foi realizada após a fermentação. Foi realizada uma análise de aceitação e preferência de três amostras: suco fermentado não adoçado, suco fermentado adoçado com estévia e suco fermentado adoçado com sacarose. Nos sucos adoçados, foi utilizada a concentração de 8,5% para a sacarose e 0,8% de estévia (conforme recomendação do fabricante 0,8g de estévia). Para a participação, os provadores voluntários receberam uma ficha de análise sensorial, abordando a impressão global das três amostras de sucos de maracujá fermentados, por meio de aceitação, e também a preferência dos sucos e a intenção de compra.

Em todas as análises o suco foi servido à temperatura entre 16 e 18°C, em copinhos de café codificados aleatoriamente com 3 algarismos, numa quantidade de 30 mL por copinho. A aceitação de cada amostra de suco foi avaliada através da escala hedônica de 9 pontos ancoradas no extremo desgostei muitíssimo e gostei muitíssimo. As porcentagens dos valores hedônicos de 1 a 4 foram somadas e denominadas de “% de rejeição”, enquanto as porcentagens dos valores hedônicos de 6 a 9 foram denominadas de “% de aceitação”; o valor 5 foi considerado como região de indiferença (“nem gostei, nem desgostei”). Um painel de 52 provadores não treinados foi utilizado.

Resultados e discussão

Crescimento e viabilidade do *L. casei* nas duas formulações do suco de maracujá fermentado

Os sucos de maracujá com *L. casei* foram fermentados por 20 horas, e durante esse tempo, no intervalo de 2 horas, foi avaliada a biomassa formada para análise do crescimento do

microrganismo em ambas as formulações do suco. Os resultados para biomassa (g mL^{-1}), do crescimento do microrganismo nos sucos de maracujá com pH original e pH ajustado para 6,0, estão expressos como mostram a Tabela 1 e a Figura 2.

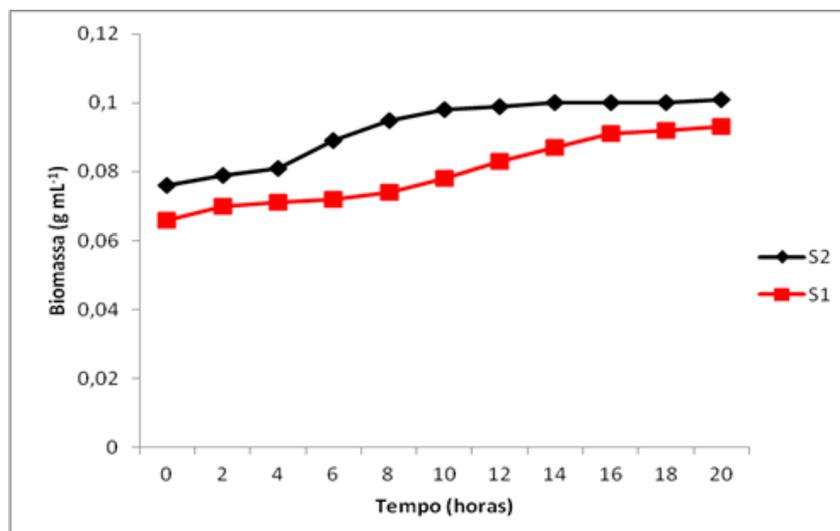
Pode-se notar pela Tabela 1 e pela Figura 2, que houve crescimento microbiano ao longo do processo de fermentação.

Tabela 1: Biomassa (g mL^{-1}) do *L. casei* ao longo das 20h de fermentação dos sucos S₁ e S₂

Tempo de Fermentação (h)	S ₁	S ₂
	Biomassa (g mL^{-1})	Biomassa (g mL^{-1})
0	0,066	0,076
2	0,07	0,079
4	0,071	0,081
6	0,072	0,089
8	0,074	0,095
10	0,078	0,098
12	0,083	0,099
14	0,087	0,100
16	0,091	0,100
18	0,092	0,100
20	0,093	0,101

Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 2: Biomassa (g mL^{-1}) do *L. casei* ao longo das 20 horas de fermentação dos sucos S₁ e S₂



Fonte: elaborado pelos autores.

Mostram que nas primeiras cinco horas de fermentação, o microrganismo apresentou baixo crescimento, caracterizando a sua fase lag ou de adaptação. Após, o crescimento é

acelerado até às dezesseis horas de fermentação, o que caracteriza sua fase log de crescimento. Após 17 horas de fermentação, nota-se crescimento lento e se estabiliza até a vigésima hora de fermentação do suco.

Silveira (2009) refere que as bactérias ácido lácticas, crescem bem em ambientes neutro ou próximos à neutralidade, com pH variando entre 5,5 – 7,5, essa autora verificou que o pH 6,5 foi o que propiciou maior crescimento do *L. casei*. Isto pode explicar o maior crescimento no suco que foi ajustado para pH 6,0 (Figura 2), quando comparado ao do suco com pH 3,03.

Os números de células iniciais e finais não são indicadores confiáveis de crescimento, pois a evolução da curva de multiplicação dos microrganismos englobam 4 fases: a fase lag, onde parece não haver aumento no número de microrganismos, a fase log ou de crescimento propriamente dito, a fase estacionária, onde as células não se multiplicam, mas podem consumir substratos do meio para sua manutenção e a fase de morte celular, onde o número de microrganismos decresce exponencialmente (PELCZAR et al.,1996). Então, a tomada de amostras para contagem de células no início da fermentação e no fim tem a função de constatar a variação do crescimento celular e com o acompanhamento de alguns parâmetros físico-químicos, como pH, acidez, quantificação de açúcares, é possível avaliar globalmente esta multiplicação microbiana.

A Tabela 2 mostra os resultados da viabilidade do *L. casei* no início e após o término da fermentação.

Tabela 2: Contagem de células viáveis de *L. casei* no S₁ e S₂

Tempo (h)	S ₁		S ₂	
	<i>L. casei</i> (UFC mL ⁻¹)	<i>L. casei</i> (log UFC mL ⁻¹)	<i>L. casei</i> (UFC mL ⁻¹)	<i>L. casei</i> (log UFC mL ⁻¹)
0	1,37 x 10 ⁶	6,1	4,0 x 10 ⁶	6,6
20	1,18 x 10 ⁷	7,1	2,5 x 10 ⁸	8,4

Fonte: elaborado pelos autores.

Verifica-se pela Tabela 2, que ocorreu crescimento celular de 1 ciclo logarítmico no suco de maracujá com pH original fermentado, entre o início da fermentação (0 horas) e o seu término (20 horas), atingindo assim valores de 1,18 x 10⁷ células probióticas viáveis. E no suco de maracujá com pH ajustado para 6,0, ocorreu crescimento celular de 1,8 ciclos logarítmicos, atingindo 2,5 x 10⁸ células probióticas viáveis, após o término da fermentação. Ambas as formulações apresentaram valores de células viáveis dentro dos padrões recomendados pela ANVISA (BRASIL, 2008).

Alguns autores ao estudarem o crescimento de bactérias ácido lácticas em sucos vegetais fermentados a uma temperatura de 30°C, observaram que esses microrganismos são capazes de crescer bem nesses substratos. Yoon et al. (2004) observaram que o *L. casei* cresceu rapidamente em suco de tomate, sendo capaz de manter viabilidade acima de 10^8 UFC mL⁻¹ após 48 h de fermentação a 30°C. Após 48 h de fermentação de suco de repolho a 30°C, as bactérias ácido lácticas *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. plantarum* foram capazes de crescer bem no suco sem suplementação de nutrientes, apresentando viabilidade próxima a 10^8 UFC mL⁻¹ (YOON et al., 2006), assim como o suco de maracujá fermentado S₂ deste trabalho.

Coelho (2009), ao realizar fermentação de suco de laranja, observou crescimento celular de apenas 2,2 ciclos logarítmicos para um inóculo inicial de 2×10^7 UFC mL⁻¹. Zhou et al. (2009) ao produzirem leite fermentado com *L. casei* observaram um crescimento celular em torno de dois ciclos logarítmicos. Neste trabalho, observou-se crescimento celular menor ao analisado nas pesquisas por esses autores, que foi de somente 1 ciclo Log na formulação S₁ e 1,8 ciclos Log na formulação S₂ para um inóculo inicial de $1,37 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

Neves (2005), ao realizar fermentação de suco de maçã, observou que os *L. acidophilus* apresentaram crescimento máximo de 0,5 ciclos Log em maçã Gala e pH do meio modificado para 5,5 e o *L. casei* obteve 0,7 ciclos Log de crescimento em suco de maçã Gala, sendo menores que os crescimentos apresentados nas formulações S₁ e S₂ dos sucos de maracujá fermentados.

Viabilidade do *L. casei* ao longo do armazenamento do suco de maracujá fermentado sob refrigeração

Após a fermentação, os sucos fermentados foram armazenados por 21 dias à 4°C, para realização da viabilidade do microrganismo. A refrigeração foi aplicada para estocagem e distribuição do produto, pois a temperatura de refrigeração é importante para controlar o crescimento do *L. casei* (KNORR, 1998). Na Tabela 5 encontram-se os resultados da análise da viabilidade, no período de 21 dias, das duas formulações do suco de maracujá fermentado.

Pode-se notar pela Tabela 3 através das análises microbiológicas que houve perda da viabilidade celular do *L. casei* presente na formulação S₁. A concentração inicial de $1,18 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ apresentado pelo suco de maracujá fermentado a 30°C por 20 h foi reduzida a $4,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ após 7 dias quando o suco foi armazenado em recipiente de vidro à 4°C, apresentando uma diminuição de 1,5 ciclos Log.

No entanto, o suco S₁ apresentou número de bactérias viáveis suficiente, $1,18 \times 10^7$, para ser enquadrado como produto probiótico por até 6 dias de armazenamento sob refrigeração, esse valor está dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira para produtos lácteos fermentados (10^6 UFC mL⁻¹). Após esse período, o número de bactérias viáveis foi insuficiente, apresentando o suco ao final de 21 dias de armazenamento $2,7 \times 10^3$ UFC mL⁻¹.

O suco de maracujá fermentado S₂, apresentou inicialmente $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. A viabilidade do *L. casei* permaneceu suficiente para enquadrar o produto como probiótico por até 21 dias de armazenamento a 4°C, quando o suco apresentou $2,1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Tabela 3: Concentração de células viáveis do *L. casei* no S₁ e S₂ por 21 dias à 4°C

Tempo de estocagem (dias)	S ₁		S ₂	
	<i>L. casei</i> (UFC mL ⁻¹)	<i>L. casei</i> (log UFC mL ⁻¹)	<i>L. casei</i> (UFC mL ⁻¹)	<i>L. casei</i> (log UFC mL ⁻¹)
0	$1,18 \times 10^7$	7,1	$2,5 \times 10^8$	8,4
7	$4,0 \times 10^5$	5,6	$2,29 \times 10^8$	8,4
14	$2,4 \times 10^4$	4,4	$2,9 \times 10^8$	8,4
21	$2,7 \times 10^3$	3,4	$2,1 \times 10^8$	8,3

Fonte: elaborado pelos autores.

A partir dos dados obtidos nesse trabalho comparado com os dados da literatura, é possível apontar o pH ácido como responsável pela perda da viabilidade celular do *L. casei* na formulação S₁, mesmo este tendo sido armazenado a 4°C.

Vinderola et al. (2000) observaram a manutenção de células de microrganismos probióticos em queijos acidificados a pH 2 e 3 mantidos a 37°C por 3 horas. Os *L. casei* apresentaram morte celular de 5 ciclos log em pH 2 e maior estabilidade em pH 3 com um decréscimo de 1 ciclo Log, demonstrando-se ácido-resistentes. E neste trabalho, após o armazenamento de 21 dias, o suco S₁ apresentou morte celular de 3,7 ciclos Log.

Yoon et al. (2004) comentam que os principais fatores para a redução da viabilidade dos organismos probióticos são a redução do pH do meio e o acúmulo de ácidos orgânicos com resultado da fermentação. Yoon et al. (2005) avaliaram a viabilidade do *L. casei*, *L. plantarum* e *L. delbruekii* em suco de beterraba fermentado a 30°C por 72 h após estocagem sob refrigeração e constataram que o número de células viáveis desses microrganismos foi gradualmente reduzido quando armazenados a 4°C, mas permaneceram com contagem acima de 10^8 UFC mL⁻¹ após 4 semanas de estocagem. Nesse trabalho o suco S₂ foi o único que permaneceu com contagem de 10^8 UFC mL⁻¹ após 4 semanas de estocagem.

Yoon et al. (2006) constataram que o *L. casei* não sobreviveu à condições de baixo pH e elevada acidez do suco de repolho fermentado, perdendo completamente a viabilidade após 2 semanas de estocagem sob refrigeração. A viabilidade pode ter sido afetada pela produção de substâncias inibitórias produzidas durante a estocagem. Assim como o suco S₁ deste trabalho, que após 4 semanas de estocagem sob refrigeração apresentou grande perda de viabilidade.

Análises físicas e químicas do suco de maracujá

Os resultados das análises de pH, acidez total, acidez láctica, °Brix e teor de vitamina C dos sucos de maracujá fermentados podem ser observados nas Tabela 4 e 5.

As Tabelas 4 e 5 mostram que durante 20 h de fermentação do suco de maracujá, houve uma queda nos valores de °Brix, explicado pelo o consumo de açúcares presentes no meio, os quais provavelmente foram convertidos em célula (biomassa) microbiana (Tabela 1) e produtos de fermentação como ácidos orgânicos (expressos em acidez total), tendo como consequência a diminuição do pH.

Tabela 4: Resultados das análises físicas e químicas da formulação com pH original (S₁) no período de 20 horas de fermentação

Tempo(h)	pH	Acidez total (%)	Acidez láctica (g L ⁻¹)	°Brix	Vitamina C (mg mL ⁻¹)
0	3,03	10,9	0,18	3,3	136
20	2,72	11,4	0,45	2,6	218

Fonte: elaborado pelos autores.

Tabela 5: Resultados das análises físicas e químicas da formulação com pH ajustado para 6,0 (S₂) no período de 20 horas de fermentação

Tempo(h)	pH	Acidez total (%)	Acidez láctica (g L ⁻¹)	°Brix	Vitamina C (mg mL ⁻¹)
0	6,0	1,1	0,18	3,5	136
20	4,44	6,63	5,0	2,5	136

Fonte: elaborado pelos autores.

O S₁ apresentou pH 3,03 ao início da fermentação e ao final teve seu pH diminuído para 2,72, apresentando uma pequena diminuição, pois o meio já possuía pH bem baixo no início da fermentação. O suco fermentado S₂ foi ajustado inicialmente para pH 6,0 e ao final da fermentação apresentou pH 4,44, o que mostra a produção de ácidos pelo microrganismo.

Korbenkandi et al. (2008) ao utilizarem cultura de *L. casei* durante a produção de iogurte probiótico, observaram que após 5 h de fermentação, o pH do produto reduziu de 6,6 para 4,6. Yoon et al. (2004) ao estudarem a fermentação de suco de tomate com *L. casei*, observaram que o microrganismo reduziu o pH inicial do suco de 4,1 para valores inferiores a 3,5 após 72 h de fermentação, não sendo necessária a correção do pH e suplementação de nutrientes para o crescimento dessa bactéria.

Yoon et al. (2005) ao estudarem o comportamento das BAL em suco de beterraba, observaram que *L. acidophilus* e *L. plantarum* reduziram o pH inicial do suco de 6,3 para abaixo de 4,5 após 48 h de fermentação, enquanto o *L. casei* e o *L. delbrueckii* reduziram o pH até 5,0 após 72 h de fermentação, pois eles têm menor habilidade em produzir ácido lático.

Ao longo do processo fermentativo não houve perdas de Vitamina C nos sucos de maracujá. Pode-se observar o alto teor de vitamina C presente nas formulações S₁ e S₂ após a fermentação, sendo respectivamente 218 mg mL⁻¹ e 136 mg mL⁻¹. Coelho (2009) observou uma concentração de 730,7 mg L⁻¹ de ácido ascórbico (vitamina C) no suco de laranja após 20 h de fermentação.

Foi verificada também, a veracidade da produção de gás. Isso explica o aumento da acidez e a redução do pH ao longo das 20 horas de fermentação e conferindo as informações da literatura (VARNAM; SUTHERLAND, 1999).

A Tabela 6 apresenta a concentração de ácido lático observado ao longo da fermentação. Pode-se observar que na formulação S₁ houve uma produção restrita de ácido lático. Em ambientes que são muito ácidos, a produção de ácido lático pode ser é nula ou mínima (SALMINEM, 2004).

Analisando as concentrações de ácido lático, inicial e final da fermentação do *L. casei* nos sucos fermentados de maracujá, verifica-se que durante as 20 h de fermentação houve um aumento de 0,27g L⁻¹ de ácido lático no S₁ e de 4,82g L⁻¹ no S₂. Dessa maneira, o S₂ tendo ajuste de pH na sua formulação inicial, apresentou melhores condições para o desenvolvimento do *L. casei*, conseqüentemente maior produção de ácido lático.

A acidificação do meio, causada pela produção de ácido lático, observada no processo fermentativo, justifica o uso deste como agente de conservação do suco, pois ao término da fermentação as formulações S₁ e S₂ apresentaram pH 2,72 e 4,44 respectivamente.

Tabela 6: Concentração de ácido láctico (g L^{-1}) durante a fermentação do S₁ e S₂

Tempo de Fermentação (h)	S ₁	S ₂
	Ácido láctico (g L^{-1})	Ácido láctico (g L^{-1})
0	0	0
2	0,18	0,18
4	0,18	0,18
6	0,27	0,18
8	0,36	0,36
10	0,38	0,9
12	0,42	1,9
14	0,43	2,6
16	0,43	3,8
18	0,43	4,2
20	0,45	5,0

Fonte: elaborado pelos autores.

De acordo com Vlieg; Huegenholtz (2007), as bactérias ácido lácticas são assim denominadas por fermentarem açúcares, produzindo ácido láctico como principal metabolismo. Elas agem acidificando os produtos alimentares, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e aumentando o período de conservação dos produtos fermentados em relação à matéria-prima não fermentada (FARIA et al., 2006).

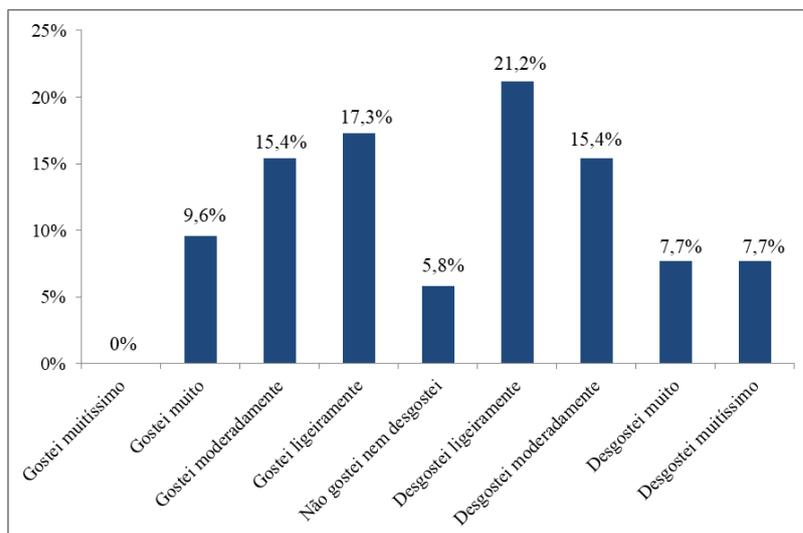
Análise sensorial

O suco S₂ não foi submetido para análise sensorial, devido ao sabor residual da base a ele adicionado inicialmente, portanto não apresentou sabor agradável para ser oferecido ao público. Somente o S₁ foi submetido à análise sensorial como descrito no item 4.2.11.

Participaram da análise sensorial 52 provadores, dos quais somente 1 era intolerante à lactose. Destes provadores, 50% disseram gostar muitíssimo de leite fermentado (Yakult), 46% disseram apenas gostar ou gostar pouco e 4% disseram não gostar. Os que disseram consumir suco de maracujá frequentemente foram 35% dos provadores.

De acordo com o teste de aceitação do suco de maracujá fermentado não adoçado (Figura 6), observou-se que 42,3% apresentaram frequência de notas na zona de aceitação, 5,8% na zona de indiferença e 51,9% na zona de rejeição. Considerando que o suco foi elaborado a partir de uma polpa de maracujá sem adição de açúcar, e que os açúcares naturalmente existentes no suco foram consumidos durante a fermentação, o sabor pouco doce do produto pode ter contribuído com o percentual de rejeição do suco. Os provadores comentaram que essa amostra apresentou ser muito ácida e com sabor bem acentuado do maracujá.

Figura 6: Distribuição dos provadores (n=52) de acordo com aceitação do suco de maracujá fermentado sem açúcar



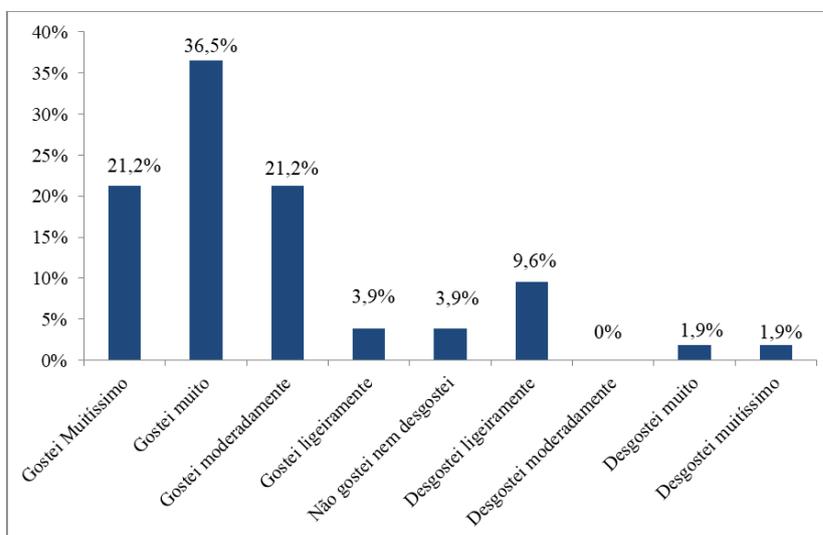
Fonte: elaborado pelos autores.

De acordo com o teste de aceitação do suco de maracujá fermentado adoçado com estévia (Figura 7), pode-se observar que 82,7% apresentaram frequência de notas na zona de aceitação, enquanto 3,9% situaram-se na zona de indiferença e 13,5% na zona de rejeição. E no teste do suco de maracujá fermentado adoçado com sacarose (Figura 8), pode-se observar que 96% apresentaram frequência de notas na zona de aceitação, enquanto 1,9% enquadraram-se na zona de indiferença e 1,9% na zona de rejeição.

Tais resultados mostram que o estévia e o açúcar podem ser utilizados como uma estratégia para melhorar a aceitação do suco de maracujá fermentado com probiótico, uma vez que a adição destes fez com que a aceitação do suco aumentasse de 42,3%, no suco não adoçado, para 82,7% e 96% no suco adoçado com estévia e adoçado com açúcar respectivamente.

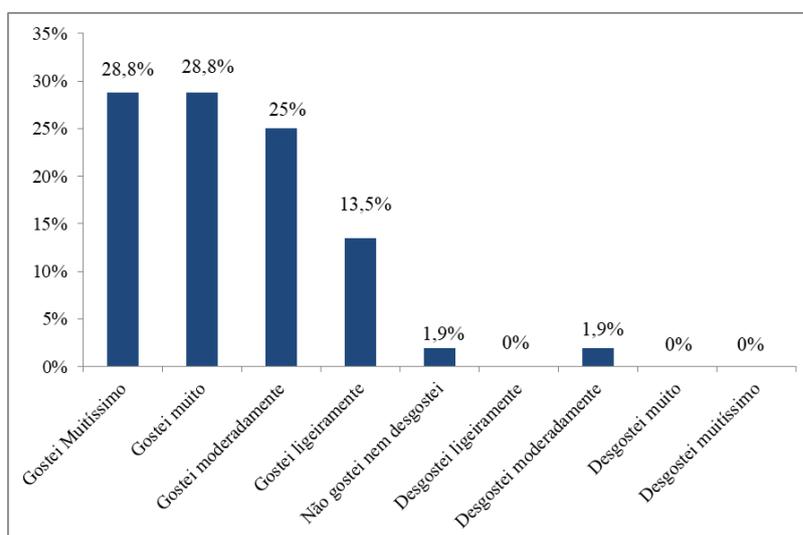
Faria et al. (2006) observaram que a concentração de açúcar adicionada ao leite fermentado não influencia a viabilidade de *L. casei*, pois, os açúcares naturalmente presentes no alimento já são suficientes para o metabolismo do microrganismo. Desta forma, a adição de estévia e sacarose tem apenas a finalidade de proporcionar características sensoriais adequadas ao paladar do consumidor brasileiro, que prefere produtos doces.

Figura 7: Distribuição dos provadores (n=52) de acordo com aceitação do suco de maracujá fermentado adoçado com estévia



Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 8: Distribuição dos provadores (n=52) de acordo com aceitação do suco de maracujá fermentado adoçado com açúcar



Fonte: elaborado pelos autores.

Marcellini et al. (2005) ao compararem a aceitação do suco de abacaxi adoçado com sacarose e com estévia em concentrações equivalentes, observaram que o suco com sacarose foi mais aceito do que o que utilizou a estévia como edulcorante.

Faria et al. (2006) observaram que a concentração de açúcar adicionada ao leite fermentado não influencia a viabilidade de *L. casei*, pois os açúcares naturalmente presentes no

alimento já são suficientes para o metabolismo do microrganismo. Desta forma, a adição de estévia e sacarose tem apenas a finalidade de proporcionar características sensoriais adequadas ao paladar do consumidor brasileiro, que prefere produtos doces.

Neste trabalho, apesar dos percentuais de notas na zona de aceitação (Tabela 7) ter sido maiores para a sacarose em relação à estévia, essa diferença foi de apenas 13,3% entre as notas obtidas para esses dois sucos. Os dois sucos adoçados, no entanto, tiveram notas superiores ao do suco não adoçado.

Tabela 7: Resultados de percentagem de aceitação, indiferença e rejeição de suco de maracujá fermentado não adoçado, adoçado com estévia e adoçado com açúcar

Amostra	Impressão global		
	% de aceitação	% de indiferença	% de rejeição
Não adoçado	42,3	5,8	51,9
Adoçado com estévia	82,7	3,9	13,5
Adoçado com açúcar	96	1,9	1,9

Fonte: elaborado pelos autores.

Para cada amostra de suco de maracujá fermentado, 33,3%, 61,9% e 46,4% dos provadores disseram que certamente comprariam o suco não adoçado, o suco adoçado com estévia e o suco adoçado com açúcar respectivamente.

Apesar do teste de impressão não ter apontado diferença entre a aceitação do suco adoçado com açúcar e estévia, o teste de preferência realizado entre esses sucos mostra que o primeiro foi preferido por 53,8% dos provadores, enquanto o segundo foi preferido por 40,4%. Apenas 5,8% dos provadores relataram ter preferência pelo suco não adoçado.

Marcellini et al. (2005) comentam que a intensidade e persistência do gosto doce e a presença ou não do gosto residual são fundamentais para a aceitação e preferência dos edulcorantes por parte dos consumidores. Assim, o sabor residual atribuído à estévia pode ter contribuído para uma maior preferência pelo suco adoçado com sacarose. Mesmo assim, vários provadores comentaram que o sabor do suco adoçado com estévia apresentou estar agradável ao paladar, porém outros disseram estar muito doce e com sabor residual de edulcorante.

Independente das diferenças de impressão global observadas entre os três sucos, não adoçado e adoçados, todos apresentaram uma frequência satisfatória dentro da zona de aceitação.

O suco de maracujá é uma bebida que possui boa aceitação no mercado, podendo ser boa alternativa para a fermentação por microrganismos probióticos, desde que estes não alterem tanto o aspecto sensorial do produto ou mesmo que seja valorizado seus aspectos funcionais.

O *L. casei* testado mostrou boa adaptação ao suco de maracujá ajustado com NaOH, mantendo sua viabilidade dentro dos limites estipulados pela legislação para uma bebida probiótica, durante todo o período de armazenamento sob refrigeração. Em contrapartida, as demais formulações não apresentaram tal viabilidade durante o armazenamento de 21 dias, não podendo ser classificados como probióticos devido à perda de viabilidade das bactérias ácido lácticas.

O suco de maracujá com pH original apresentou perda de viabilidade celular mais pronunciada ao longo do armazenamento quando comparado como suco de maracujá com pH ajustado, o qual manteve o número suficiente de bactérias viáveis para caracterizá-lo como probiótico por 21 dias.

A fermentação a 30°C por 20 h mostrou ser eficiente para o desenvolvimento do *L. casei* nas formulações dos sucos. E o tempo de armazenamento máximo foi de 21 dias, sem perda de viabilidade para a função probiótica do suco fermentado com pH ajustado inicialmente.

O produto final do processo de fermentação do suco de maracujá sem ajuste de pH necessita de modificações em sua formulação para apresentar viabilidade por mais de 6 dias durante a estocagem e ser classificado como bebida probiótica.

A aceitação do suco foi maior para os sucos adoçados quando comparada à do suco não adoçado, mostrando que a sacarose e o estévia proporcionam melhora no sabor do suco fermentado. Apesar de não haver diferença significativa na aceitação entre sacarose e estévia, no teste de preferência a sacarose foi a preferida pela maioria dos provadores.

A partir dos resultados obtidos com crescimento, viabilidade e aceitação, o suco de maracujá fermentado com *L. casei* tem um grande potencial para tornar-se uma alternativa saudável e isenta de lactose no mercado de alimentos funcionais contendo probióticos, mostrando-se um substrato eficiente. Porém, deve-se estudar aditivos reguladores de acidez que sejam utilizados para substituir o NaOH no ajuste de pH, pois este deixou sabor residual no suco após a fermentação.

- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington, 1995.
- BISTROM, M.; NORDSTROM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Food Science & Technology, Amsterdam**, n. 11, v. 13, p. 372-379, 2002.
- BRANDT, K.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal: revisões e ensaios. **Revista Brasileira de Pediatria**, São Paulo, v.28. n. 2, p. 117-127, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos produtos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Julho de 2008.
- COELHO, J.C. **Elaboração de bebida probiótica a partir do Suco de Laranja Fermentado com *Lactobacillus casei***. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- COSTA, G. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos "in vitro". **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the evaluation of probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. 11p. Abr/Mai, 2002.
- FERNÁNDEZ, M. F., BORIS, S. e BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 449-455, 2003.
- FREITAS, S. F. **Roteiro para aula prática de Química Analítica Quantitativa. Departamento de Química - UFG - CAC (Experimento 9)**, 2013.
- FUCHS, Renata Hernandez Barros et al. Iogurte de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Rev. Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, jan./mar. 2005.
- GOMES, M.S. **Estudo da pasteurização de suco de laranja utilizando ultrafiltração**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- GRANATO, D.; BLANCO, G.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. et al., Functional foods and non-dairy probiotic product food development: trends, concepts and products. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, v.9, p. 292-302, 2010.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, São Paulo, 2008.
- KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 9, p. 295-306, 1998.
- KORBENKANDI, H.; JAHADI, M.; MARACY, M.; ABEDI, D.; JALALI, M. Production and evaluation of a probiotic yogurt using *Lactobacillus casei ssp. casei*. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p. 75-79, 2008.
- KOUZEKI L. A. DE; SOARES J. C.; ROSA L. F.; GONÇALVES S. R. C.; MARINELLI P. S.; SOARES G. L.; DORTA C. Viabilidade celular de *Lactobacillus casei* após a fermentação do suco de laranja com adição de extrato de levedura. **Revista Analytica**, São Paulo, n.66, ago/set 2013.
- KOUZEKI, L.A. **Bebida probiótica obtida da fermentação de suco de laranja enriquecida com extrato de levedura**. 2012. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Faculdade de Tecnologia de Marília, Marília, 2012.



- LAZADO, C. C. et al. In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2-4, p. 252-259, 2011.
- LIMA, E. T. et al. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 71, n. 2, p. 103- 107, 2007.
- MAARA - Ministério Da Agricultura E Reforma Agrária. **Maracujá para exportação: Aspectos técnicos da produção**. Brasília, 1996.
- MATSUMOTO, S. et al. Probiotic *Lactobacillus* induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cell. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 140, n. 3, p. 417-429, 2005.
- MÄYRÄ-MÄKINEN, A.; BIGRET, M. **Industrial use and production of lactic acid bacteria**. Lactic acid bacteria - microbiology and functional aspects. Nova Iorque: Marcel Dekker, p. 73-102, 1998.
- NASCIMENTO, M.; MORENO, I.; KUAYE, A. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brasilian Journal Food Technology**, Campinas. v.11, n.2, p.120-127. Abr./Jun, 2008.
- OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n.1, jan./mar. 2002.
- PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia – conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 2 ed., v. 1, 524p. 1996.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SANTOS, F. L. et al. Utilização de probióticos na redução da anemia ferropriva. **Diálogos e Ciência**, Salvador, v. 7, n. 4, p. 13-18, 2008.
- SILVA, A. M. et al. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n.1, p. 29-37, 2004.
- SILVEIRA, M. S. **Utilização do suco e xarope de caju para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- URALA, N.; LAHTEENMAKI, L. Consumers changing attitudes toward functional foods. **Food Quality and Preference**, v.18, p.16-22, 2007.
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Beverages – technology, chemistry and microbiology**. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 464 p., 1999.
- VINDEROLA, C. G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1905-1911, 2000.
- ZHOU, Q.; WANG, J.; GUO, Z.; YAN, L.; ZHANG, Q.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. Fermentation characteristics and transit tolerance of *Lactobacillus casei* Zhang in reconstituted mare milk during storage. **Int. J. of Dairy Tech.**, v. 62, n. 2, p. 249-254, maio 2009.