

Campus Maracanã

Programa de Pós-graduação *stricto sensu*  
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos

Ana Paula de Oliveira Ribeiro

Desenvolvimento de uma bebida mista  
de banana, morango e juçara com  
propriedades probióticas

Rio de Janeiro

2018

ANA PAULA DE OLIVEIRA RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA MISTA DE BANANA, MORANGO E  
JUÇARA COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de  
Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de  
Janeiro como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos.

Orientadores:

Prof. D.Sc. Eduardo Henrique Miranda Walter

D.Sc. Flávia dos Santos Gomes

Rio de Janeiro – RJ

2018

Ficha catalográfica elaborada por  
Sergio Pinheiro Rodrigues  
CRB7-3684

- R484 Ribeiro, Ana Paula de Oliveira.  
Desenvolvimento de uma bebida mista de banana, morango e juçara com propriedades probióticas / Ana Paula de Oliveira Ribeiro. – Rio de Janeiro, 2018.  
58f. ; 21 cm.
- Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2018.
- Orientadora: Prof. D.Sc. Eduardo Henrique Miranda Walter e  
Prof. D.Sc. Flavia dos Santos Gomes
1. Juçara. 2. Bebida não fermentada. I. Walter, Eduardo Henrique Miranda. II. Gomes, Flavia dos Santos. III. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 664.86

À Helena.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo equilíbrio e paz;

Ao meu marido Rodrigo, por todo apoio e paciência, pelas idas ao Instituto, pelos programas baixados e por resolver todas as minhas dúvidas com computadores;

À minha família, pelo incentivo e carinho;

Aos meus orientadores, pelos ensinamentos e por embarcarem nessa reta final comigo em tempo recorde;

À banca, pelos ensinamentos e por me ajudarem a melhorar este trabalho;

À Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela utilização de diversos laboratórios, especialmente às equipes dos Laboratórios de Bioacessibilidade, Plantas 1 e 2, Microbiologia, Cromatografia Líquida, Análise Sensorial e Instrumental e Físico-química;

Aos professores do IFRJ pelos ensinamentos e oportunidade, e aos amigos da classe pela cumplicidade e amizade.

Muito obrigada!

## RESUMO

A polpa de juçara tem se mostrado uma alternativa interessante no desenvolvimento de diversos produtos devido ao seu alto valor nutricional e propriedades potencialmente funcionais. Uma bebida não fermentada à base de juçara adicionada de probióticos apresenta os benefícios dos microrganismos vivos, sem alterações nas características sensoriais, e com alto valor funcional agregado. A refrigeração é uma tecnologia já conhecida por prolongar a vida útil de bebidas, mas ela também pode ser utilizada para controlar a fermentação. No entanto, a baixa temperatura empregada pode afetar a viabilidade dos probióticos, sem mencionar a importância de avaliar o impacto das matrizes de origem vegetal na viabilidade das culturas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida mista de banana, morango e juçara, não fermentada, com propriedades probióticas, utilizando cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, além de estudar a viabilidade das culturas e sua sobrevivência ao trato gastrointestinal, o controle da fermentação e as estabilidades físico-química, microbiológica e sensorial das bebidas ao longo de 90 dias de estocagem sob refrigeração. Os resultados da viabilidade probiótica indicaram que as cepas de lactobacilos utilizadas se adaptaram melhor à matriz mista utilizada, em comparação com a bifidobactéria, especialmente *Lactobacillus casei* e *L. plantarum*, que se mantiveram com padrão acima da legislação. Para os testes de sobrevivência ao trato gastrointestinal, a bebida com *Lactobacillus plantarum* apresentou 8 log UFC/200 mL até 30 dias de armazenamento. Nas análises sensoriais, a bebida inoculada com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* mostrou diferenças significativas em relação a bebida controle (sem adição de probióticos), ao contrário das bebidas com lactobacilos. Além disso, os resultados indicaram que a refrigeração é tecnologia adequada para a conservação das bebidas e controle de fermentação.

Palavras-chave: juçara; probiótico; bebida não fermentada; viabilidade; sobrevivência gastrointestinal.

## ABSTRACT

The pulp of juçara has been shown an interesting alternative in the development of several products due to its high nutritional value and potentially functional properties. A non-fermented juçara based drink added with probiotics shows the benefits of living microorganisms, with no changes in their sensory characteristics, and with high aggregate functional value. Cooling is a technology already known to extend the life of beverages, but it can also be used to control fermentation. However, the low temperature employed may affect the viability of probiotics, not to mention that it is important to evaluate the impact of plant origin matrices on the viability of the probiotics. In this context, the objective of this work was to produce a non - fermented mixed banana, strawberry and juçara beverage with probiotic properties, using strains of *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, in addition to studying the viability of the cultures and their survival to the gastrointestinal tract, fermentation control, physical-chemical stability, microbial deterioration and sensorial characteristics of the beverages during 90 days of storage under refrigeration. The results of the probiotic viability indicated that the strains of lactobacilli used were better adapted to the mixed matrix used, compared to bifidobacteria, especially *Lactobacillus casei* and *L. plantarum*, which remained above standard legislation. For the gastrointestinal tract survival tests, the beverage with *Lactobacillus plantarum* presented 8 log CFU/200 mL up to 30 days of storage. In the sensorial analyzes, the drink inoculated with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* showed significant differences in relation to the control drink (without addition of probiotics), unlike the beverages with lactobacilli. In addition, the results indicated that refrigeration is appropriate technology for beverage preservation and fermentation control.

Keywords: juçara; probiotic; unfermented beverage; viability; gastro-intestinal survival.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração 1:</b> Palmeira de juçara e frutos de juçara.....	19
<b>Ilustração 2:</b> Esquema de produção e avaliação da bebida probiótica de juçara.....	24
<b>Ilustração 3:</b> Esquema do ensaio <i>in vitro</i> de simulação das condições do trato gastrointestinal.....	32
<b>Ilustração 4:</b> Cromatograma de antocianinas totais nas bebidas com probióticos.....	38



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Exemplos de produtos probióticos no mercado.....	14
<b>Tabela 2</b> – Culturas de bactérias mais utilizadas em alimentos probióticos. ....	15
<b>Tabela 3</b> – Critérios desejáveis para aplicações comerciais de probióticos em alimentos. ....	16
<b>Tabela 4</b> – Estudos <i>in vitro</i> de sobrevivência de probióticos às condições do trato gastrointestinal desde 2010.....	18
<b>Tabela 5</b> – Caracterização físico-química da bebida mista de banana, morango e juçara.....	34
<b>Tabela 6</b> – Viabilidade dos probióticos durante 90 dias de armazenamento das bebidas a $3,8 \pm 0,6$ °C. ....	35
<b>Tabela 7</b> – pH e acidez total titulável das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a $3,8 \pm 0,6$ °C.....	36
<b>Tabela 8</b> – Açúcares redutores das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a $3,8 \pm 0,6$ °C. ....	37
<b>Tabela 9</b> – Cianidina-3-O-rutinosídeo das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a $3,8 \pm 0,6$ °C.....	39
<b>Tabela 10</b> – Parâmetros de cor instrumental das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a $3,8 \pm 0,6$ °C. ....	40
<b>Tabela 11</b> – Frequência de avaliações sensoriais das bebidas com probióticos em comparação com a bebida controle. ....	41
<b>Tabela 12</b> – Sobrevivência dos probióticos nas bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a $3,8 \pm 0,6$ °C ao ensaio <i>in vitro</i> das condições do trato gastrointestinal. ....	42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
	2.1 GERAL .....	13
	2.2 ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
	3.1 PROBIÓTICOS .....	14
	3.1.1 Desenvolvimento de produtos probióticos .....	16
	3.1.2 Avaliação da sobrevivência de probióticos às condições do trato gastrointestinal .....	17
	3.2 JUÇARA .....	19
	3.2.1 Descrição botânica .....	20
	3.2.2 Composição química .....	20
	3.3 MORANGO .....	21
	3.4 BANANA .....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
	4.1 MATERIAL .....	25
	4.1.1 Matérias-primas .....	25
	4.1.2 Culturas .....	25
	4.1.3 Reagentes .....	25
	4.1.4 Equipamentos .....	26
	4.2 MÉTODOS .....	26
	4.2.1 Centrifugação da polpa de juçara .....	26
	4.2.2 Obtenção da polpa de banana .....	27
	4.2.3 Elaboração da bebida mista de banana, morango e juçara .....	27
	4.2.4 Preparo dos inóculos .....	27
	4.2.5 Produção das bebidas com probióticos .....	27
	4.2.6 Caracterização físico-química da bebida mista .....	28
	4.2.7 Avaliação das bebidas com probióticos ao longo do armazenamento .....	28
	4.2.8 Avaliação da sobrevivência das culturas probióticas às condições do trato gastrointestinal	
	31	
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	34
	5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA MISTA .....	34

5.2 AVALIAÇÃO DAS BEBIDAS COM PROBIÓTICOS AO LONGO DO ARMAZENAMENTO	
34	
5.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DAS CULTURAS PROBIÓTICAS AO TRATO GASTROINTESTINAL.....	42
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>8 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....</b>	<b>49</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>58</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Vários esforços têm sido empregados para o uso e valorização dos frutos da juçara, planta da Mata Atlântica que pode contribuir para a sustentabilidade deste bioma. Cabe destaque o desenvolvimento de uma bebida mista de juçara, sem adição de açúcar e com alta capacidade antioxidante (RIBEIRO *et al.*, 2017).

A juçara é uma palmeira, de mesmo gênero do açaí da Amazônia, que está amplamente distribuída pela Mata Atlântica, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (SCHULZ *et al.*, 2016). As características sensoriais e funcionais dos frutos da juçara e do açaí são similares, sendo o valor nutricional da juçara ainda maior (RIBEIRO, MENDES, PEREIRA, 2011; SCHULZ *et al.*, 2016).

Os frutos da juçara são considerados de alto valor nutricional, por seu conteúdo de ácidos graxos, fibras, proteínas, vitaminas e minerais, assim como compostos bioativos com alta capacidade antioxidante, conferida pelas antocianinas e ácidos fenólicos (BICUDO, RIBANI, BETA, 2014; INADA *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que a utilização dos frutos de juçara é uma alternativa econômica para a sustentabilidade da Mata Atlântica, tendo em vista que a extração do palmito do caule da palmeira, outrora principal meio de exploração comercial, inviabilizava a planta, aumentando desta forma, o risco de extinção da espécie (MULER *et al.*, 2014; SCHULZ *et al.*, 2016).

Os alimentos com propriedades probióticas apresentam uma crescente demanda e estão amplamente distribuídos no mercado, sendo em sua maioria lácteos, como iogurtes, leites fermentados, queijos, sorvetes e alimentos infantis em pó (HOLZAPFEL, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SHORI *et al.*, 2016).

Considerando os efeitos benéficos dos probióticos, torna-se importante diversificar as pesquisas, associando-os às funcionalidades de outros alimentos que não sejam lácteos, como, por exemplo, sucos de frutas, já que os derivados de leite, em algumas situações, podem causar intolerância e alergia alimentar (SILVA *et al.* 2017).

Neste contexto, a agregação de probióticos em sucos de frutas apresenta-se como opção eficaz para o consumo diário e regular de um produto saudável e com propriedades funcionais.

Para que exerçam sua atividade probiótica, os microrganismos vivos precisam estar em quantidade adequada no produto e, ainda, resistir às condições adversas da digestão,

chegando ao intestino em dose suficiente para se desenvolver e, efetivamente, promover os benefícios ao hospedeiro (FAO, OMS, 2006; ANVISA, 2002; ANVISA, 2016).

Neste contexto, este trabalho foi conduzido como uma forma de reduzir a escassez de dados sobre bebidas vegetais probióticas e em atendimento às exigências legais relacionadas ao estudo de viabilidade e resistência de probióticos. No desenvolvimento das bebidas, foram considerados o impacto desta matriz e das condições de estocagem no controle de fermentação e nas características sensoriais das bebidas, ao longo de 90 dias de estocagem sob refrigeração.

Este projeto de dissertação do Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos do IFRJ é parte das ações do projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento e validação de um sistema contínuo para produção e envase de bebidas com probióticos não fermentadas”, do Edital Embrapa na Chamada 13/2014 - Prioridades do Portfólio Alimentos, Nutrição e Saúde e está em alinhamento com (i) o documento “Visão 2014 – 2034: O futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira”; (ii) às prioridades do portfólio “Alimentos, nutrição e saúde”; e (iii) à agenda de prioridades da Embrapa Agroindústria de Alimentos, no tema “Qualidade de Alimentos”.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Desenvolver uma bebida mista de banana, morango e juçara, não fermentada, com probióticos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir bebidas adicionadas de cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* e *L. casei*;
- Avaliar o controle de fermentação, a viabilidade probiótica e as estabilidades físico-química, microbiológica e sensorial das bebidas ao longo de 90 dias de estocagem sob refrigeração;
- Estudar a sobrevivência ao trato gastrointestinal dos probióticos das bebidas que apresentem pelo menos 8 log UFC/200 mL e menos de duas reduções decimais na concentração inicial de probióticos, ao final de 90 dias de estocagem.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PROBIÓTICOS

Quando administrados em quantidades suficientes, probióticos são microrganismos vivos que promovem benefícios à saúde do consumidor (ANVISA, 2002; FAO, WHO, 2006). Usualmente são consumidos sob a forma de alimentos, fermentados ou não, e sob a forma de suplementos alimentares (cápsulas, tabletes ou pó). Os alimentos contendo probióticos são classificados como alimentos funcionais (ANVISA, 2016).

A Tabela 1 lista alguns exemplos de probióticos disponíveis no mercado.

**Tabela 1** – Exemplos de produtos probióticos no mercado.

<b>Categoria</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Marca</b>	<b>Probiótico</b>	<b>Alegação funcional</b>	<b>Dose diária recomendada</b>
<b>Leites fermentados</b>	Yakult	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal	80 g
	Nestlé	Chamyto	<i>Lactobacillus johnsoni</i> (LA1); <i>Lactobacillus helveticus</i>	Melhora e regula o funcionamento da microbiota intestinal	200 g
	Danone	Activia	<i>Bifidobacterium animalis</i> (DN 173010)	Ajuda a equilibrar a microbiota intestinal	200 g
<b>Iogurtes</b>	Batavo	Biofibras	<i>Bifidobacterium lactis</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Restabelecimento da microbiota intestinal	180 g
<b>Suplementos</b>	Merck	Floratil	<i>Saccharomyces boulardii</i> (DN17)	Auxilia na restauração da microbiota intestinal e no tratamento da diarreia	Cápsula de 200 mg
	Sanofi	Enterogermina	<i>Bacillus clausii</i>	Contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal	1 a 3 flaconetes de 5 mL

As bactérias ácido-láticas são bacilos ou cocos Gram positivos, não formadores de esporos, catalase e oxidase negativos, geralmente não móveis, que metabolizam carboidratos originando, principalmente, ácido lático. Os gêneros que compõem este grupo são: *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Carnobacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp.,

*Pediococcus* sp. e *Leuconostoc* sp. Estas bactérias podem ser encontradas em diversos ambientes, como solo e água, além do trato gastrointestinal e urogenital humano (GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2012).

As bifidobactérias possuem diversas características semelhantes às bactérias ácido-láticas, mas se diferem por serem bacilos, anaeróbios e por possuírem um metabolismo heterofermentativo, produzindo além do ácido láctico outros compostos, como o ácido acético (GOMES, MALCATA, 1999).

As culturas mais amplamente utilizadas em alimentos são as bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. A Tabela 2 relata as principais bactérias utilizadas.

**Tabela 2** – Culturas de bactérias mais utilizadas em alimentos probióticos.

<b>Gênero</b>	<b>Espécies</b>
<b><i>Lactobacillus</i> sp</b>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii ssp.</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> .
<b><i>Bifidobacterium</i> sp</b>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentes</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. longum</i> .
<b><i>Enterococcus</i> sp</b>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
<b><i>Streptococcus</i> sp</b>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i> .

Fonte: TRIPATHI, GIRI, 2014, p. 227.

Diversos benefícios à saúde têm sido atribuídos ao consumo das bactérias probióticas, especialmente às cepas *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* BB-12, tais como: manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, prevenção contra rotavírus; redução de dermatites atópicas em crianças e ação contra hipercolesterolemia (SAXELIN *et al.*, 2005). Tripathi e Giri (2014) citam ainda como efeitos dos probióticos a melhora do sistema imunológico, atividade anticarcinogênica, proteção contra patógenos gastrointestinais, prevenção de osteoporose, diarreia infantil, constipação e doenças urogenitais. Os mesmos autores relatam pesquisas da década de 1970 nas quais já se constatava uma redução significativa de colesterol sérico através da ingestão de leites fermentados e fórmulas infantis contendo lactobacilos.

Os benefícios dos probióticos podem resultar de ações distintas: interação dos microrganismos vivos com o hospedeiro no intestino humano, e, ainda, através dos metabólitos produzidos pela fermentação destas bactérias (STANTON *et al.*, 2005).



No entanto, a efetividade do alimento probiótico é dependente da cepa utilizada (FAO, WHO, 2006; GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016). A Tabela 3 apresenta critérios desejáveis para a seleção do probiótico para aplicação em alimentos.

**Tabela 3** – Critérios desejáveis para aplicações comerciais de probióticos em alimentos.

<b>Critério</b>	<b>Propriedade</b>
<b>Segurança</b>	Ausência de patogenicidade e fatores de virulência.
<b>Tecnológico</b>	Estabilidade genética das cepas, viabilidade durante processo e estocagem, boas propriedades sensoriais, produção em larga escala.
<b>Funcional</b>	Tolerância à bile e ácidos gástricos, adesão a superfícies de mucosa intestinal.
<b>Fisiológico</b>	Imunomodulação, atividade antagônica ao metabolismo de colesterol e lactose, propriedade antimutagênicas e anticarcinogênicas.

Fonte: FAO, WHO, 2006; TRIPATHI, GIRI, 2014.

### 3.1.1 Desenvolvimento de produtos probióticos

A demanda por alimentos com propriedades probióticas apresenta um crescimento consistente. O sucesso destes alimentos nas últimas décadas adveio de diversos produtos, em sua maioria de origem láctea, tais como iogurtes, leites fermentados, queijos e alimentos infantis em pó (OLIVEIRA *et al.*, 2017; SHORI *et al.*, 2016).

Parte da população mundial não utiliza produtos lácteos devido à intolerância à lactose, alergias ao leite ou dietas com restrição ou ausência de alimentos de origem animal (SILVA *et al.*, 2017). Esta situação tem desencadeado o desenvolvimento de alimentos probióticos utilizando matrizes não lácteas, a partir de matérias-primas de origem vegetal, tais como soja, cereais e sucos de frutas.

A seleção do alimento empregado como matriz é a peça chave no desenvolvimento de produtos com probióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os critérios para a seleção de uma matriz alimentícia na formulação de um alimento probiótico são os seguintes: segurança, saúde, economia, aspectos ambientais, conveniência e características sensoriais (FAO, WHO, 2006; TRIPATHI, GIRI, 2014).

A fermentação é um dos processos mais conhecidos e estudados para a preparação de alimentos probióticos. Entretanto, os produtos formados pelo metabolismo dos açúcares presentes no alimento base pelos microrganismos probióticos, sendo de origem láctea ou não, podem ocasionar sabores e odores indesejáveis ao produto final (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Por este motivo, o controle da fermentação no processamento de alimentos probióticos contribui para uma melhor aceitação sensorial do produto, e a condução de análises sensoriais nos

produtos formulados é de extrema importância para avaliar o impacto da adição das culturas à matriz.

### **3.1.2 Avaliação da sobrevivência de probióticos às condições do trato gastrointestinal**

Segundo Tripathi e Giri (2014), os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais presentes no intestino humano. Os lactobacilos têm como hábitat preferencial o intestino delgado e as bifidobactérias, o intestino grosso.

Para promover os benefícios adequados ao consumidor, as culturas probióticas devem sobreviver às condições do trato gastrointestinal e chegar ao intestino grosso em quantidade suficiente para colonizar e reproduzir (SILVA *et al.*, 2017; SHORI, 2017).

Segundo a RDC 02/2002, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 8 a 9 log UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. A documentação referente à comprovação de eficácia deve incluir um laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e um teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares.

Em documento divulgado pela Anvisa em 2016, que trata da alegação das propriedades funcionais, a Anvisa mantém a necessidade de apresentação do laudo que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo ao final do prazo de validade do produto e nas condições de uso, armazenamento e distribuição.

Desta forma, torna-se muito importante avaliar a sobrevivência destas culturas, para garantir que elas cheguem viáveis até o intestino, onde de fato poderão atuar.

Madureira e colaboradores (2005) testaram um método estático, que submetia as culturas probióticas às condições adversas do trato gastrointestinal, simulando *in vitro* a adição de suco gástrico, suco pancreático e bile, além das alterações de pH. Algumas formulações de alimentos probióticos vem sendo testadas segundo modelos semelhantes. Cabe ressaltar que existem ainda os métodos dinâmicos, em equipamentos que simulam o trato gastrointestinal humano, assim como estudos *in vivo*.

A Tabela 4 apresenta uma relação de produtos com probióticos que foram submetidos a estudos *in vitro* de sobrevivência às condições gastrointestinais a partir desta década.

**Tabela 4** – Estudos *in vitro* de sobrevivência de probióticos às condições do trato gastrointestinal desde 2010.

<b>Produto</b>	<b>Probiótico</b>	<b>Autor</b>
<b>Chocolate meio amargo</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> .	Silva <i>et al.</i> , 2017
<b>Salsichas desidratadas</b>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> e <i>L. fermentum</i> .	Han <i>et al.</i> , 2017
<b>Kefir</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	De Lima <i>et al.</i> , 2017
<b>Chocolate preto</b>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. reuteri</i> .	Succi <i>et al.</i> , 2017
<b>Sorvete de maçã (soja e leite)</b>	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. animalis</i> .	Matias <i>et al.</i> , 2016
<b>Yogurte de soja</b>	<i>L. fermentum</i> e <i>L. plantarum</i> .	Saito <i>et al.</i> , 2014
<b>Queijo coalho</b>	<i>B. animalis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>L. casei</i> .	De Oliveira <i>et al.</i> , 2014
<b>Yogurte de soja com manga, goiaba e okara</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> .	Bedani <i>et al.</i> , 2014
<b>Produtos de soja fermentados</b>	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. animalis</i> .	Bedani, Rossi e Saad, 2013
<b>Leites fermentados comerciais</b>	<i>L. casei</i> .	Vinderola <i>et al.</i> , 2011
<b>Queijo</b>	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. animalis</i> .	Madureira <i>et al.</i> , 2011
<b>Mousse de goiaba (contendo leite)</b>	<i>L. acidophilus</i> .	Buriti, Castro e Saad, 2010

Com relação às matrizes utilizadas, é possível observar que os estudos *in vitro* da sobrevivência de probióticos à simulação das condições do trato gastrointestinal são realmente escassos em produtos não lácteos. Há estudos realizados em matrizes de soja e apenas três utilizando frutas, contudo, em ambos, há utilização de leite ou soja, ou os dois. Não foram encontrados nesta pesquisa nenhum estudo *in vitro* utilizando produtos de matriz somente fruta. Bedani e colaboradores (2014) corroboram esta observação. Segundo os autores, há poucas investigações sobre o impacto da utilização de polpas de frutas na viabilidade da cultura probiótica. Para eles, estudos que observem o efeito de polpas de frutas na sobrevivência de culturas probióticas à simulação das condições do trato gastrointestinal são raros.

### 3.2 JUÇARA

O consumo de frutas é altamente recomendado por suprir nutrientes e auxiliar na prevenção de doenças. Frutos tropicais vêm ganhando destaque junto a comunidade científica nos últimos anos, em função de suas características nutricionais e funcionais. É o caso da juçara (*Euterpe edulis* Martius, gênero *Euterpe*, família *Arecaceae*): um fruto arredondado produzido por uma palmeira, amplamente distribuída pela Mata Atlântica (SCHULZ *et al.*, 2016).

Segundo Bicudo, Ribani e Beta (2014), a juçara é encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, desde o estado do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro, e também na Bahia. Sua produção vem ganhando destaque, devido a seu alto valor nutricional: possui altas teores de ácidos graxos, fibras, proteínas, vitaminas e minerais. Possui ainda compostos bioativos tais como: antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos (SCHULZ *et al.*, 2016).



**Ilustração 1:** Palmeira de juçara e frutos de juçara.

Foto: Virgínia Martins da Matta.

Vários autores já determinaram o teor de compostos fenólicos na juçara. Estes compostos possuem atividade antioxidante e são capazes de reduzir os riscos de doenças crônicas não transmissíveis (BICUDO, RIBANI, BETA, 2014).

Outro fator importante a ressaltar é que há algumas décadas, devido a extração ilegal do palmito de juçara, esta espécie sofreu grave ameaça de extinção, e o consumo dos frutos da

juçara vem sendo incentivado nos últimos anos, de forma a utilizar a planta de uma forma mais sustentável (SCHULZ *et al.*, 2016).

Muler e colaboradores (2014) afirmam que a exploração dos frutos da juçara surgiu da necessidade de uma exploração mais racional e sustentável da espécie, não sendo necessário, para tal, cortar a palmeira.

Além disso, sua semelhança com o açaí tradicional, encontrado em palmeiras da Amazônia brasileira, a espécie *Euterpe oleraceae* Martius, contribui como um guia para o consumo de frutos de juçara. Sem contar que os frutos da juçara (*Euterpe edulis* Martius) possuem maior valor nutricional se comparado ao açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) (RIBEIRO, MENDES, PEREIRA, 2011; SCHULZ *et al.*, 2016).

### **3.2.1 Descrição botânica**

Representada por cerca de 2600 espécies, a família *Arecaceae*, popularmente conhecida por palmeira, compreende 240 gêneros. O gênero *Euterpe* abrange 28 espécies, distribuídas desde as Antilhas até a América do Sul, em biomas de florestas tropicais. As diferenças entre as espécies se devem principalmente ao crescimento e localização (SCHULZ *et al.*, 2016).

Segundo Schulz e colaboradores (2016), a juçara ocorre em condições climáticas que variam de 17 a 26 °C, principalmente nos meses de março até junho, e é um fruto pequeno, arredondado, não climatérico, com coloração que pode variar de verde à negra.

### **3.2.2 Composição química**

Schulz e colaboradores (2015) verificaram uma faixa de variação de pH da polpa de juçara entre 4,5 e 5,6. De acordo com os mesmos autores, no que diz respeito aos lipídeos, a juçara possui, em sua maioria, ácidos graxos monoinsaturados (45,5%–56,8% em base seca), especialmente o ácido oleico, que representa 35,9%. Ácidos graxos poliinsaturados, tais como o linoleico e linolênico, além de gorduras saturadas, como o ácido palmítico também são encontrados em menor quantidade.

Com relação ao conteúdo proteico, Inada e colaboradores (2015) determinaram teores de 6% a 7,5% para a polpa de juçara em base seca. Para os mesmos autores, o conteúdo de carboidratos presente na polpa de juçara é semelhante ao do açaí, entre 28,3% e 42,5%.

O conteúdo mineral presente nos frutos da juçara abrange 17 minerais diferentes, sendo os macroelementos mais encontrados: o potássio, o cálcio, o magnésio, o fósforo e o

sódio; e os microelementos: o ferro, o manganês e o zinco. Em comparação com o açaí, a juçara apresenta valores superiores de potássio, cálcio e magnésio, e inferiores de manganês e zinco (INADA *et al.*, 2015).

Com relação ao conteúdo de fibras dietéticas, segundo Inada e colaboradores (2015), a juçara apresentou um teor de 27%, em base seca.

Os frutos da juçara se destacam pelo teor de compostos fenólicos. Estes compostos compreendem os ácidos fenólicos: gálico, ferúlico e cumárico, os flavonoides, que abrangem as antocianinas, e os flavonoides não-antociânicos: rutina e quercetina (BICUDO, RIBANI, BETA, 2014; SCHULZ *et al.*, 2016).

As antocianinas são cianidinas ligadas a açúcares, sendo um importante grupo de compostos fenólicos presentes na juçara. Existem 20 antocianinas conhecidas, entretanto apenas seis são mais frequentes: cianidina, malvidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina e petunidina. As antocianinas diferem entre si devido a diversos fatores, como: número de hidroxilas, número de ácidos alifáticos e aromáticos, nas ligações com os resíduos glicosídeos, grau de metoxilação e número e posição de glicosilação. As antocianinas majoritárias na juçara são a cianidina 3-glicosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo (LORENZI, 2006; SERAVALLI, RIBEIRO, 2004).

A juçara possui uma concentração de antocianinas superior, se comparada ao açaí, e ainda, com outras 17 frutas tropicais (SCHULZ *et al.*, 2016).

Schulz e colaboradores (2015) encontraram valores de 634,3 mg/100 g de antocianinas monoméricas em frutos de juçara, expressos em cianidina 3-glicosídeo.

Bicudo, Ribani e Beta (2014) destacam que devido à sua solubilidade em água, as antocianinas também podem ser usadas como corantes naturais em alimentos, evitando desta maneira o uso de corantes artificiais.

### 3.3 MORANGO

A produção de morango se destaca em vários estados do Brasil, desde a região Sul e Sudeste, até o Distrito Federal, Bahia e Ceará, com destaque para Minas Gerais (ANUÁRIO, 2015). Embora no Brasil a produção não ultrapasse 3,3 mil toneladas por ano (FAO, 2017), é uma atividade em crescente demanda, devido a sua alta rentabilidade (ANUÁRIO, 2015).

Um dos problemas encontrados na produção do morango é sua alta taxa respiratória, o que contribui para que esta fruta seja altamente perecível (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Por este motivo, além de ser utilizada *in natura*, este fruto por ser comercializado sob forma de polpas

congeladas ou em preparações, como caldas, bebidas, sorvetes, geleias e biscoitos (GIAMPIERI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Neste trabalho, a polpa de morango adicionada à bebida mista utilizada como matriz para as bebidas com probióticos foi utilizada com o intuito de equilibrar o pH e reduzir a probabilidade de crescimento microbológico (RIBEIRO *et al.*, 2017).

Quanto à sua composição química (Quadro 1), os morangos são uma fonte relevante de compostos bioativos, devido seu alto conteúdo de vitamina C e folatos. Assim como a juçara, o morango possui compostos fenólicos, que conferem atividade antioxidante e podem reduzir os riscos doenças, como as doenças cardiovasculares e crônicas não transmissíveis (GIAMPIERI *et al.*, 2012).

Ribeiro e colaboradores (2017) encontraram 223 mg/100 g de compostos fenólicos totais, expressos em ácido gálico, na polpa de morango. Um dos compostos fenólicos presentes no morango é o ácido elágico, que possui valores altos de bioacessibilidade, devido a hidrólise dos elagitaninos no pH alcalino do meio intestinal (CASSANI *et al.*, 2018).

**Quadro 1** – Composição química do morango cru (100g)

<b>Umidade</b>	91,5 g
<b>Carboidratos</b>	6,8 g
<b>Proteínas</b>	0,9 g
<b>Lipídios</b>	0,3 g
<b>Ácido ascórbico</b>	63,6 mg
<b>Folato</b>	24 µg

Fonte: TACO, 2011.

O alto conteúdo de fibras dietéticas (cerca de 2 g/100 g) presentes no morango pode contribuir para a redução dos níveis de açúcar no sangue. O morango também possui ácidos graxos insaturados, vitaminas, minerais, ligninas e taninos (GIAMPIERI *et al.*, 2012).

### 3.4 BANANA

A banana é uma fruta tropical cultivada no Brasil e em diversos países. A produção de bananas ocupa uma posição de grande destaque, pois é o fruto mais consumido no Brasil e o segundo no mundo (ANUÁRIO, 2015). Segundo dados da FAO (2017), a sua produção no Brasil no último ano foi de 6,7 milhões de toneladas.

A banana é considerada uma das principais fontes de energia em populações humildes de regiões tropicais, podendo ser consumida crua, cozida, verde, madura, e em diversas preparações, como sobremesas (AURORE, PARFAIT, FAHRASMANE, 2009).

Neste trabalho, a utilização da banana na elaboração da bebida mista utilizada como matriz para as bebidas com probióticos confere o sabor doce e auxilia na aceitação sensorial (RIBEIRO *et al.*, 2017), já que a bebida mista não é adicionada de açúcar.

Quanto à sua composição química, a banana possui cerca de 75% de água e na porção sólida restante apresenta uma grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 20%), e em menor escala proteínas, lipídeos, vitamina C e minerais. O potássio é o mineral mais abundante, seguido de magnésio e fósforo (AURORE, PARFAIT, FAHRASMANE, 2009; TACO, 2011).

O Quadro 2 apresenta os principais constituintes da banana nanica crua (100g) (TACO, 2011).

**Quadro 2** – Composição química da banana nanica crua (100g)

<b>Umidade</b>	73,8 g
<b>Carboidratos</b>	23,8 g
<b>Proteínas</b>	1,4 g
<b>Lipídios</b>	0,1 g
<b>Ácido ascórbico</b>	5,9 mg
<b>β-Caroteno</b>	68 µg
<b>Potássio</b>	376 mg
<b>Magnésio</b>	30 mg
<b>Fósforo</b>	27 mg

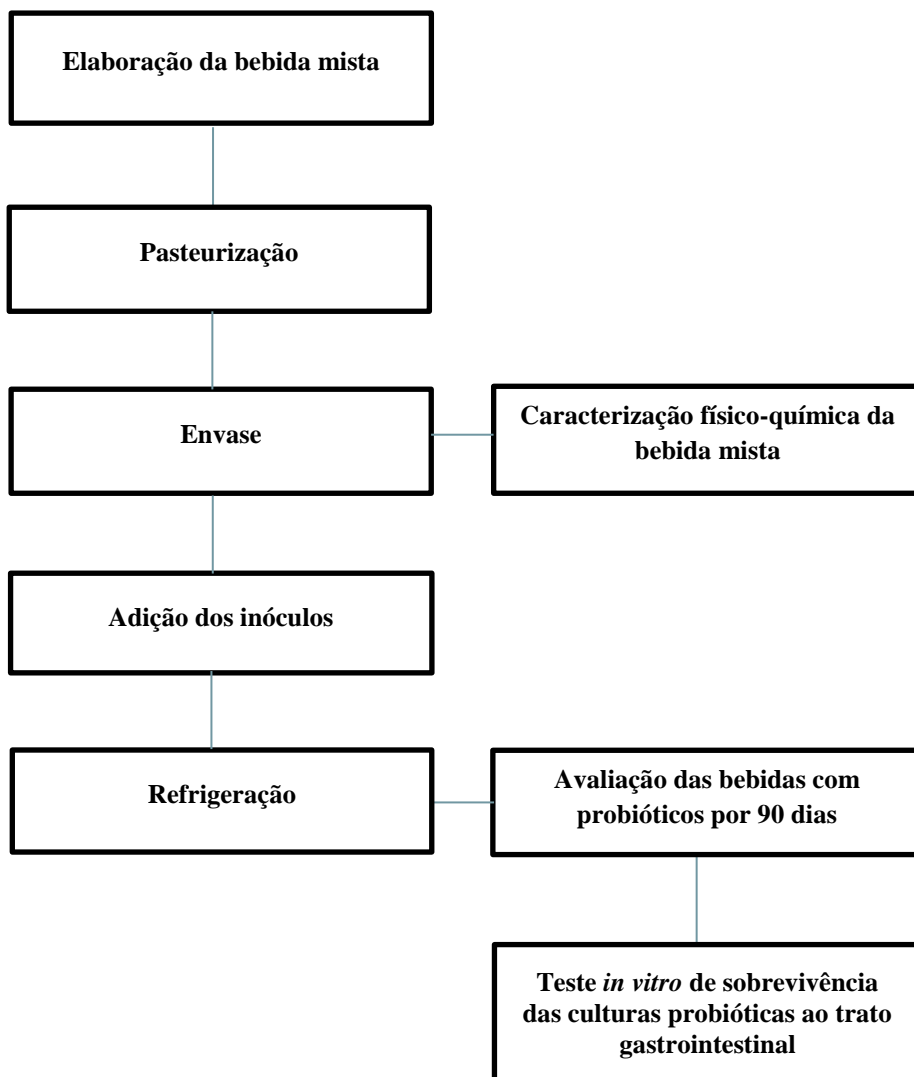
Fonte: TACO, 2011.

As bananas também possuem piridoxina (vitamina B6) (LEKLEM, 1999), havendo evidências de que esta vitamina é eficaz na proteção contra o câncer de esôfago (WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL, 2007). Além disso, a polpa banana contém cerca de 28 mg/100 g de compostos fenólicos (RIBEIRO *et al.*, 2017).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O método utilizado neste trabalho consistiu de diferentes etapas, realizadas na Embrapa Agroindústria de Alimentos, de acordo com a Ilustração 2.



**Ilustração 2:** Esquema de produção e avaliação da bebida probiótica de juçara.

Inicialmente, a bebida mista foi produzida utilizando polpas comerciais de juçara e de morango e polpa de banana nanica recém extraída. Após a pasteurização e envase, análises físico-químicas foram realizadas a fim de caracterizar a mesma.

Em seguida, os inóculos foram preparados e adicionados à bebida mista, de forma a obter produtos com diferentes culturas probióticas, nas concentrações recomendadas pela legislação.

A partir dos resultados obtidos com a avaliação das bebidas com probióticos, durante 90 dias, sob refrigeração, a sobrevivência das culturas probióticas ao trato gastrointestinal foi avaliada.

#### 4.1 MATERIAL

##### 4.1.1 Matérias-primas

- Polpa de banana nanica, recém extraída de bananas adquiridas em comércio local;
- Polpa de juçara congelada, cedida pela empresa Ciano Indústria de Alimentos Ltda., localizada na Serrinha do Alambari, Resende (RJ);
- Polpa de morango congelada, adquirida no comércio local do Rio de Janeiro.

##### 4.1.2 Culturas

- Fermentos lácteos em pó: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12, Chr. Hansen; *Lactobacillus acidophilus* LA-5, Chr. Hansen; *Lactobacillus casei* BGP93, Sacco.
- Cultura fresca: *Lactobacillus plantarum*, CNPC003, Embrapa.

##### 4.1.3 Reagentes

- Acetonitrila HPLC, Tedia;
- Ácido clorídrico P.A., Sigma;
- Ácido láctico P.A., Merck;
- Ácido sulfúrico P.A., Merck;
- Ágar Desoxicolato-lisina-xilose, XLD, Merck;
- Ágar Dicloran Rose Bengal Base, DRBC, Merck;
- Ágar Man Rogosa Sharpei, MRS, Merck;
- Ágar Mueller-Kauffmann Tetracionato, MKTT, Merck;
- Anaerocult A. Merck;
- Bile pancreática bovina e ovina, Sigma;
- Caldo Escherichia coli, EC, Merck;
- Caldo Lauril Sulfato Triptose, LST, Merck;
- Caldo Rappaport Vassiladis, RV, Merck;
- Éter etílico P.A., Merck;
- Éter de petróleo P.A., Merck;
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Sigma;

- Hidróxido de sódio P.A, Sigma;
- Lipase pancreática, Sigma;
- Pancreatina suína, Sigma;
- Pepsina gástrica suína, Sigma;
- Peptona de caseína, BD;
- Tampões de pH 4,00 e 7,00, Merck.

#### **4.1.4 Equipamentos**

- Autoclave Phoenix;
- Balança analítica, Schimadzu;
- Banho ultrassônico 2510, Branson
- Banho-maria com agitação, Dubnoff, Nova Técnica;
- Câmaras de refrigeração e congelamento, Engepom;
- Centrífuga de cestos, International Equipment;
- Color Quest XE, Hunterlab;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Waters;
- Data Logger, HOBO ProV2;
- Despolpadeira Bonina compacta, Itametal;
- Estufa, Memmert;
- Extrator automático de gordura, Ankon XT15;
- Incubadora BOD, Marconi;
- Medidor de pH, TecnoPON;
- Mufla, Jung;
- Refratômetro, Atago;
- Titulador automático, Methrom.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Centrifugação da polpa de juçara**

A polpa de juçara foi centrifugada em centrífuga de cesto, marca International Equipment, equipada com malha de nylon de 150 µm por 10 minutos, de forma a reduzir a consistência arenosa da polpa.

#### **4.2.2 Obtenção da polpa de banana**

As bananas foram descascadas manualmente e despulpadas em despulpadeira Bonina 0,25dF compacta, marca Itametal, equipada com peneira de 1,5 mm.

#### **4.2.3 Elaboração da bebida mista de banana, morango e juçara**

A partir das matérias-primas citadas no item 4.1.1, a bebida mista foi formulada, conforme composição descrita por Ribeiro e colaboradores (2017), contendo 20% de juçara, 40% de banana e 40% de morango. Em seguida, a bebida foi pasteurizada a 90° C/35 segundos em trocador de calor tubular e envazada em embalagens de vidro, previamente esterilizadas em autoclave por 121 °C/15 minutos.

#### **4.2.4 Preparo dos inóculos**

As culturas empregadas na elaboração das bebidas com probióticos foram previamente enumeradas quanto às suas viabilidades.

Especificamente para o *Lactobacillus plantarum*, por se tratar de uma cultura fresca, antes da análise de viabilidade foram feitas duas ativações por 20 horas a 37 °C em 9 mL de Caldo MRS. Uma terceira ativação foi realizada em 200 mL de Caldo MRS por mais 20 horas a 37 °C. A partir desta última cultura foram retiradas quatro alíquotas de 30 g para tubos de centrífuga. Estes tubos foram submetidos a três centrifugações da seguinte forma: 10.000 g/20 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo em água peptonada 0,1 %. A partir dos pellets da terceira centrifugação, a cultura foi pesada e diluída para análise de viabilidade.

A partir das populações de cada probiótico, as culturas foram misturadas com alíquotas da bebida mista em temperatura menor que 10 °C, de forma a obter inóculos com concentração entre 8 a 10 log UFC/mL utilizando técnicas assépticas. Em seguida, estes inóculos foram transferidos para um refrigerador e acondicionados por 30 minutos, com agitações em intervalos sucessivos de 5 minutos, de modo a permitir a hidratação e dispersão das culturas previamente à inoculação (MULLER *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

#### **4.2.5 Produção das bebidas com probióticos**

Os inóculos foram adicionados à bebida mista em fluxo laminar. As embalagens foram agitadas, de forma a garantir a homogeneidade do produto. Considerando a utilização de

quatro culturas probióticas, foram preparadas quatro formulações distintas e mais um controle (bebida mista sem probióticos), totalizando cinco tratamentos, em dois lotes de produção.

#### **4.2.6 Caracterização físico-química da bebida mista**

De forma a caracterizar a bebida mista, foram realizadas análises físico-químicas da mesma, em duplicata, conforme descrições a seguir:

- Sólidos solúveis (°Brix): Método de leitura direta (AOAC, 2016), em refratômetro digital, marca Atago;
- Umidade: Método gravimétrico (AOAC, 2016), em estufa, marca Memmert, a 70 °C e pressão de 70 mm de Hg;
- Cinzas: Método gravimétrico (AOAC, 2016), em mufla, marca Jung, a 550 °C;
- Nitrogênio total: Método Kjeldahl. A proteína foi calculada multiplicando-se o valor de Nitrogênio Total pelo fator 5,75 (AOAC, 2016);
- Extrato etéreo: Método de extração (AOCS, 2005), utilizando extrator automático de gordura, marca Ankon;
- Carboidratos: Determinado pela diferença entre 100 e o somatório das concentrações de umidade, cinzas, proteínas e extrato etéreo (AOAC, 2016);
- pH: Método titulométrico (AOAC, 2016), utilizando titulador automático, marca Methrom;
- Acidez total titulável: Método titulométrico (AOAC, 2016), utilizando titulador automático, marca Methrom;

#### **4.2.7 Avaliação das bebidas com probióticos ao longo do armazenamento**

As formulações do primeiro lote de produção de bebidas foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) e acompanhadas ao longo de 90 dias. Avaliações microbiológicas, físico-químicas e sensoriais foram realizadas nos tempos 0, 30, 60, 75 e 90 dias, conforme descrito a seguir. A temperatura da câmara de refrigeração foi monitorada por meio de Data Logger, marca HOBO.

##### **4.2.7.1 Análises microbiológicas**

Para as análises microbiológicas, alíquotas das amostras foram transferidas para frascos estéreis de plástico, e as mesmas foram analisadas nos tempos determinados.

- Bolores e leveduras: Diluição seriada 1:10 em água peptonada 0,1% e método de plaqueamento em superfície em ágar DRBC, em duplicata, 3 diluições. A incubação foi conduzida a 25 °C por 5 dias, em incubadora BOD Marconi (APHA, 2015);
- *Salmonella* spp.: Método de detecção qualitativa que consiste das seguintes etapas: pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, com incubação a 37 °C por 18 horas em incubadora BOD Marconi; enriquecimento seletivo em caldo RV, com incubação a 41,5 °C por 24 horas em banho-maria Nova Técnica e em caldo MKTT com incubação de 24 horas a 37 °C em incubadora BOD Marconi; plaqueamento em ágar XLD a 37 °C por 24 horas e ágar entérico HE a 35° C por 24 horas em incubadora BOD Marconi; e confirmação bioquímica e sorológica (ISO 6579:2014);
- Coliformes a 45 °C: Diluição seriada 1:10 em água peptonada 0,1% e método de Número Mais Provável com Tubos múltiplos, 3 tubos, 3 diluições. A inoculação foi realizada em Caldo LST, com incubação a 37 °C por 24 horas em incubadora BOD Marconi, e em seguida, em Caldo EC com incubação a 44,5 °C por 24 horas em banho-maria Nova Técnica (APHA, 2015);
- *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp (viabilidade dos probióticos): Diluição seriada 1:10 em água peptonada 0,1% e método de plaqueamento em profundidade com sobrecamada em ágar MRS, em duplicata, 3 diluições. A incubação foi conduzida a 37 °C por 48 horas, em incubadora BOD Marconi. Na enumeração de *Bifidobacterium* spp., a incubação foi realizada em anaerobiose (APHA, 2015).

#### 4.2.7.2 Análises físico-químicas

Para as análises físico-químicas, foram retiradas alíquotas das amostras para frascos estéreis de plástico, nos tempos determinados, e as mesmas foram mantidas sob congelamento até 90 dias e descongeladas sob refrigeração. Este procedimento foi importante para garantir que todas as amostras estivessem em condições analíticas similares.

- pH: Método titulométrico (AOAC, 2016), realizado em duplicata, utilizando titulador automático, marca Methrom;
- Acidez total titulável: Método titulométrico (AOAC, 2016), realizado em duplicata, utilizando titulador automático, marca Methrom;
- Sacarose, frutose e glicose (açúcares redutores): Cromatografia líquida de alta eficiência, por padronização externa, utilizando coluna de fase reversa e fase móvel de acetonitrila (MACRAE, 1998). Para a preparação das amostras, uma alíquota de 1 g de

amostra foi diluída em 10 mL de água ultrapurificada a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a extração, em banho ultrassônico 2510 Branson por 20 minutos. Após esta etapa, adicionou-se 5 mL de acetonitrila e avolumou-se até 20 mL com água ultrapurificada. A solução foi filtrada em filtro de papel Whatman® e acondicionada no vial do injetor automático do cromatógrafo. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Amino 30 cm x 4,6 mm (High Performance Carbohydrate); temperatura da coluna ambiente; fase móvel de acetonitrila 75%; fluxo de 1,0 mL/min; índice de refração como detector; temperatura interna do detector 45 °C; volume de injeção de 20 µL;

- Antocianinas: Cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de fotodiodos Waters 2996 (SANTIAGO, 2010). Para a preparação das amostras, uma alíquota de 2 mL de amostra foi adicionada de 100 µL de ácido fórmico concentrado e 2 mL de solução injetora (ácido fórmico 5% em água 90: metanol 10). Em seguida, as amostras serão submetidas a extração, em banho ultrassônico 2510 Branson por 10 minutos. A solução foi filtrada em filtro 0,22 µm para um balão de 5 mL e o balão volumétrico foi avolumado com solução injetora. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna Thermo Scientific C18 2,4 µm (4,6 x 150 mm); temperatura da coluna 40°C; fase móvel gradiente de ácido fórmico 5% em água/acetonitrila; fluxo de 1,0 mL/min; temperatura do injetor 15 °C; volume de injeção de 20 µL.
- Cor instrumental: Método de transmitância no aparelho Color Quest® XE, marca HunterLab, em quatro repetições, nas escalas CIELAB, com abertura de 25 mm de diâmetro e iluminante D65/10, de acordo com o método padronizado CIE (1978). A escala CIELAB é composta pelos parâmetros: L\*, que indica luminosidade (preto quando próximo de zero e branco quando próximo de 100); a\* (verde para valores negativos, ou vermelha para valores positivos); b\* (azul para negativo, ou amarela para positivo). O  $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$  foi calculado para todas as formulações em comparação com a bebida controle em tempo 0, sendo um número absoluto que indica a diferença de sensação na totalidade da cor, incluindo brilho, tom e saturação.

#### **4.2.7.3 Análise sensorial**

Para o teste sensorial, foram utilizadas as amostras com 90 dias de estocagem, de forma a testar o maior tempo utilizado no acompanhamento das bebidas.

As análises foram conduzidas por meio de uma seção com um grupo de oito avaliadores treinados, utilizando o método de Comparação Múltipla ou Diferença do controle. Através desta metodologia, é possível comparar as características sensoriais das diferentes bebidas em relação a bebida mista sem adição de culturas. As condições foram estabelecidas conforme as recomendações de Stone e Sidel (1993). As amostras foram servidas à temperatura de  $8 \pm 2$  °C em copos plásticos de cor branca de 50 mL, codificados com números aleatórios de três dígitos. Os avaliadores foram orientados a consumir biscoitos tipo água e sal e água mineral entre as degustações, de modo a prevenir o efeito da fadiga sensorial. Os mesmos compararam cinco amostras (quatro formulações das bebidas com probióticos mais o controle sem probióticos) com uma amostra referência, contendo apenas a bebida mista de juçara, sem adição de probióticos, nos parâmetros aparência, sabor e consistência. Os testes foram realizados no programa Fizzterm0, utilizando os indicativos e valores: IGUAL (1), LIGEIRAMENTE DIFERENTE (2), MODERADAMENTE DIFERENTE (3), MUITO DIFERENTE (4) e EXTREMAMENTE DIFERENTE (5), conforme Apêndice 1.

#### **4.2.7.4 Análise estatística**

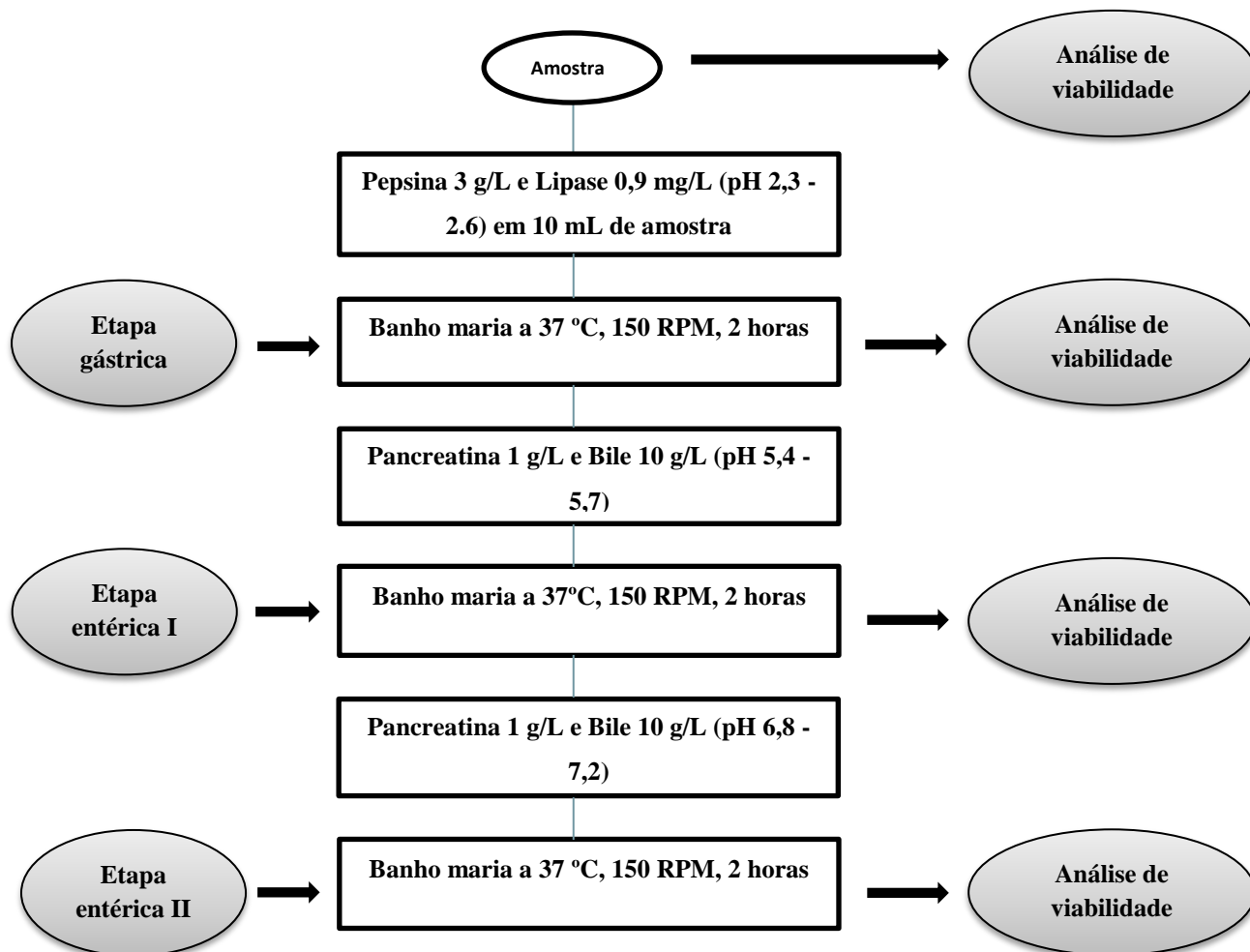
Os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas obtidos com as diferentes formulações de bebidas com probióticos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey com 5% de significância, por meio do *software* XLSTAT 2018.2 (versão gratuita). Para os resultados da análise sensorial, foram aplicadas a análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnett com 5% de significância, em substituição ao teste de Tukey, já que o teste de Dunnett é mais indicado para comparações com um controle.

#### **4.2.8 Avaliação da sobrevivência das culturas probióticas às condições do trato gastrointestinal**

Os testes de sobrevivência dos probióticos ao trato gastrointestinal foram realizados segundo metodologia *in vitro* de Liserre, Ré e Franco (2007), com as modificações de Bedani, Rossi e Saad (2013). A simulação foi realizada com as bebidas do segundo lote de produção, apenas nas amostras do primeiro lote que apresentaram, ao final dos 90 dias de armazenamento sob refrigeração, uma população mínima de probióticos viáveis de 8 log



UFC/porção de 200 mL, o que equivale a cerca de 5,7 log UFC/mL, e redução menor de 2 log sobre a concentração inicial. O procedimento foi realizado em duplicata, aos 30, 60 e 90 dias, consistindo de uma etapa gástrica e duas etapas entéricas (I e II), conforme Ilustração 3.



**Ilustração 3:** Esquema do ensaio *in vitro* de simulação das condições do trato gastrointestinal.

Para cada amostra, foram utilizados um tubo em cada fase e mais um tubo para o controle de pH, totalizando quatro tubos. Após a distribuição de 10 mL de bebida nos tubos, foi iniciado o processo de adição de enzimas e ajustes de pH, de acordo com cada fase da digestão. Para a fase gástrica, o pH foi ajustado para 2,3 – 2,6 com solução de HCl 1 M. Ainda para a fase gástrica, foram adicionadas pepsina e lipase nas concentrações de 3g/L e 0,9 mg/L, respectivamente. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C, com agitação de 150 rpm durante 2 horas.

Para simulação da fase entérica I, o pH das amostras foi elevado para 5,4 – 5,7, usando solução entérica composta por solução tampão ( $\approx$  pH 12) (150 mL de NaOH 1 M e 14 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e completando para 1000 mL com água destilada), bile e pancreatina suína,

para atingir as concentrações de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37 °C sob agitação de 150 rpm por mais 2 horas. Na fase entérica II, o pH foi ajustado para 6,8 – 7,2, utilizando a mesma solução tampão  $\approx$  pH 12, bile e pancreatina de modo que mantenham as concentrações de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente em banho-maria a 37 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 horas, atingindo um total de 6 horas de ensaio *in vitro*.

A contagem dos probióticos foi realizada no tempo zero (antes do ensaio *in vitro*) e após cada etapa (2 horas, 4 horas e 6 horas). Foram realizadas diluições sucessivas das bebidas em água peptonada 0,1% e inoculações em Ágar MRS, em profundidade e sobrecamada para os quatro probióticos, seguidas de incubação a 37 °C por 48 horas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BEBIDA MISTA

A bebida mista de banana, morango e juçara, empregada como matriz para elaboração das bebidas com probióticos, apresentou as características físico-químicas descritas na Tabela 5.

**Tabela 5** – Caracterização físico-química da bebida mista de banana, morango e juçara.

<b>Umidade</b> (g/100 g)	85,09±0,06*
<b>Cinzas</b> (g/100 g)	0,52±0,01*
<b>Proteínas</b> (g/100 g)	0,46
<b>Carboidratos</b> (g/100 g)	13,72
<b>Extrato etéreo</b> (g/100 g)	0,21±0,04*
<b>pH</b>	4,03±0,00*
<b>Acidez</b> (meq de NaOH/100 g)	7,55±0,01*
<b>Sólidos solúveis</b> (° Brix)	11,50±0,00*

\*Média dos resultados ± desvio padrão  
n=2

### 5.2 AVALIAÇÃO DAS BEBIDAS COM PROBIÓTICOS AO LONGO DO ARMAZENAMENTO

As análises de bolores e leveduras, *Salmonella* spp., coliformes a 45 °C, viabilidade dos probióticos, pH, acidez, açúcares redutores, antocianinas, cor instrumental e análise sensorial foram realizadas nas bebidas com probióticos não fermentadas, assim como na amostra controle (sem adição de probióticos), nos tempos 0, 30, 60, 75 e 90 dias de armazenamento, sob refrigeração.

A média da temperatura da câmara de refrigeração registrada foi de  $3,8 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ .

Na caracterização microbiológica das bebidas com probióticos, foi verificada em todas as formulações uma concentração de Coliformes a 45°C menor que 3 NMP/mL e ausência de *Salmonella* spp./25 mL na semana seguinte ao processamento e aos 90 dias de armazenamento. Em todas as amostras analisadas ao longo do experimento (tempos 0, 30, 60, 75 e 90 dias), a concentração de bolores e leveduras foi menor que 1,0 log UFC/mL, com

exceção de quatro bebidas: BA com 60 dias, LA com 30 dias e LC com 30 dias que continham 2,0 log UFC/mL e BA com 30 dias que apresentou concentração de 3,8 UFC/mL.

A Tabela 6 apresenta a viabilidade dos probióticos nas bebidas ao longo do período de armazenamento.

**Tabela 6** – Viabilidade dos probióticos durante 90 dias de armazenamento das bebidas a  $3,8 \pm 0,6$  °C.

<b>Bebida</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Lactobacilos e Bifidobactérias (log UFC/mL)</b>
Controle	0	$<1,0 \pm 0,00$
	30	$<1,0 \pm 0,00$
	60	$<1,0 \pm 0,00$
	75	$<1,0 \pm 0,00$
	90	$<1,0 \pm 0,00$
BA	0	$7,0 \pm 0,06^a$
	30	$4,8 \pm 0,00^b$
	60	$4,4 \pm 0,13^c$
	75	$4,2 \pm 0,21^d$
	90	$3,8 \pm 0,06^e$
LA	0	$7,9 \pm 0,01^a$
	30	$7,1 \pm 0,11^b$
	60	$5,7 \pm 0,24^c$
	75	$5,4 \pm 0,20^d$
	90	$<4,0 \pm 0,00^e$
LC	0	$7,7 \pm 0,08^{a b c}$
	30	$7,6 \pm 0,08^{b c}$
	60	$8,1 \pm 0,24^a$
	75	$7,4 \pm 0,10^{c d}$
	90	$7,1 \pm 0,07^{d e}$
LP	0	$6,2 \pm 0,02^a$
	30	$6,3 \pm 0,04^a$
	60	$6,3 \pm 0,00^a$
	75	$6,0 \pm 0,06^{a b}$
	90	$5,7 \pm 0,02^{b c}$

<sup>a-e</sup> Diferentes letras sobrescritas em uma coluna para cada bebida denotam diferenças significativas durante o período de estocagem ( $p < 0,05$ ).

BA: bebida com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

LA: bebida com adição de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

n=2

Todas as formulações foram inoculadas, inicialmente, com pelo menos 8 log UFC/200 mL, ou seja, 5,7 log UFC/mL.

Foi possível observar que houve uma diminuição nas populações dos microrganismos nas bebidas BA e LA ( $p < 0,05$ ). A bebida BA apresentou uma diminuição acentuada da

população de microrganismos já nos primeiros 30 dias de armazenamento, atingindo uma viabilidade probiótica abaixo da requerida em um curto período de tempo. Na bebida LA ocorreu uma pequena redução após 30 dias sob refrigeração, indicando um período maior de estabilidade, quando comparada com a bebida BA, sendo este, porém, menor que 60 dias. As amostras LC e LP mantiveram suas populações estáveis durante, pelo menos, 75 dias de armazenamento. Observou-se uma pequena diminuição ( $p < 0,05$ ) da viabilidade dos microrganismos probióticos a partir do 75º dia, porém as referidas populações ainda se mantiveram acima de 5,7 UFC/mL durante todo o período de estocagem.

Os resultados das análises de pH e acidez total titulável das bebidas ao longo do armazenamento estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** – pH e acidez total titulável das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a  $3,8 \pm 0,6$  °C.

Bebida	Tempo (dias)	pH (10°C)	Acidez (meq de NaOH/100g)
Controle	0	4,04±0,00	7,58±0,01
	30	4,05±0,00	7,54±0,01
	60	4,07±0,00	7,58±0,01
	75	4,06±0,00	7,53±0,07
	90	4,03±0,00	7,52±0,01
BA	0	4,05±0,00 <sup>a</sup>	7,61±0,04 <sup>a</sup>
	30	4,06±0,00 <sup>a</sup>	7,51±0,04 <sup>a</sup>
	60	4,04±0,00 <sup>a</sup>	7,55±0,02 <sup>a</sup>
	75	4,04±0,00 <sup>a</sup>	7,52±0,03 <sup>a</sup>
	90	4,07±0,00 <sup>a</sup>	7,51±0,01 <sup>a</sup>
LA	0	4,08±0,00 <sup>a</sup>	7,68±0,01 <sup>a</sup>
	30	4,07±0,00 <sup>a</sup>	7,66±0,02 <sup>a</sup>
	60	4,05±0,00 <sup>a</sup>	7,67±0,01 <sup>a</sup>
	75	4,05±0,00 <sup>a</sup>	7,66±0,03 <sup>a</sup>
	90	4,04±0,00 <sup>a</sup>	7,67±0,05 <sup>a</sup>
LC	0	4,05±0,00 <sup>a</sup>	7,59±0,02 <sup>a</sup>
	30	4,04±0,00 <sup>a</sup>	7,66±0,01 <sup>a b</sup>
	60	4,03±0,00 <sup>a</sup>	7,75±0,01 <sup>b c</sup>
	75	4,01±0,00 <sup>a</sup>	7,84±0,00 <sup>c</sup>
	90	4,00±0,00 <sup>a</sup>	7,87±0,03 <sup>c</sup>
LP	0	4,06±0,00 <sup>a</sup>	7,55±0,01 <sup>a</sup>
	30	4,05±0,00 <sup>a</sup>	7,53±0,01 <sup>a</sup>
	60	4,05±0,00 <sup>a</sup>	7,48±0,02 <sup>a</sup>
	75	4,07±0,00 <sup>a</sup>	7,54±0,07 <sup>a</sup>
	90	4,07±0,00 <sup>a</sup>	7,37±0,06 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Diferentes letras sobrescritas em uma coluna para cada bebida denotam diferenças significativas durante o período de estocagem ( $p < 0,05$ ).

BA: bebida com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

LA: bebida com adição de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

n=2

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de pH das bebidas, ao longo do período de armazenamento.

Com relação à acidez total titulável, nas bebidas BA e LA não foram observadas alterações em todo o período de armazenamento. Contudo, a bebida LC apresentou diferença significativa a partir de 30 dias de armazenamento e a bebida LP com 90 dias.

A Tabela 8 apresenta os resultados das análises de açúcares redutores (frutose e glicose) ao longo da estocagem.

**Tabela 8** – Açúcares redutores das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a  $3,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ .

Bebida	Tempo (dias)	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)
Controle	0	4,37±0,28	4,45±0,23
	30	4,28±0,06	4,41±0,06
	60	4,34±0,06	4,69±0,03
	75	4,53±0,16	4,47±0,17
	90	4,43±0,01	4,70±0,02
BA	0	4,50±0,09 <sup>a b</sup>	4,56±0,05 <sup>a b</sup>
	30	4,27±0,05 <sup>a b</sup>	4,41±0,02 <sup>a b</sup>
	60	4,12±0,07 <sup>b c</sup>	4,28±0,07 <sup>b c</sup>
	75	3,80±0,16 <sup>c</sup>	3,95±0,15 <sup>c</sup>
	90	4,58±0,01 <sup>a</sup>	4,78±0,06 <sup>a</sup>
LA	0	4,38±0,02 <sup>a</sup>	4,56±0,08 <sup>a</sup>
	30	4,21±0,05 <sup>a</sup>	4,35±0,06 <sup>a</sup>
	60	4,35±0,18 <sup>a</sup>	4,54±0,01 <sup>a</sup>
	75	4,36±0,06 <sup>a</sup>	4,57±0,05 <sup>a</sup>
	90	4,30±0,08 <sup>a</sup>	4,52±0,06 <sup>a</sup>
LC	0	4,35±0,00 <sup>a b</sup>	4,48±0,01 <sup>a b</sup>
	30	4,08±0,01 <sup>c</sup>	4,24±0,01 <sup>c</sup>
	60	4,22±0,01 <sup>b c</sup>	4,40±0,07 <sup>b c</sup>
	75	4,52±0,05 <sup>a</sup>	4,68±0,03 <sup>a d</sup>
	90	4,37±0,04 <sup>a b</sup>	4,71±0,01 <sup>d</sup>
LP	0	4,42±0,03 <sup>a</sup>	4,53±0,04 <sup>a b</sup>
	30	4,19±0,21 <sup>a</sup>	4,32±0,16 <sup>b</sup>
	60	4,58±0,04 <sup>a</sup>	4,80±0,02 <sup>a</sup>
	75	4,43±0,07 <sup>a</sup>	4,63±0,04 <sup>a b</sup>
	90	4,48±0,02 <sup>a</sup>	4,71±0,01 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> Diferentes letras sobrescritas em uma coluna para cada bebida denotam diferenças significativas durante o período de estocagem ( $p < 0,05$ ).

BA: bebida com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

LA: bebida com adição de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

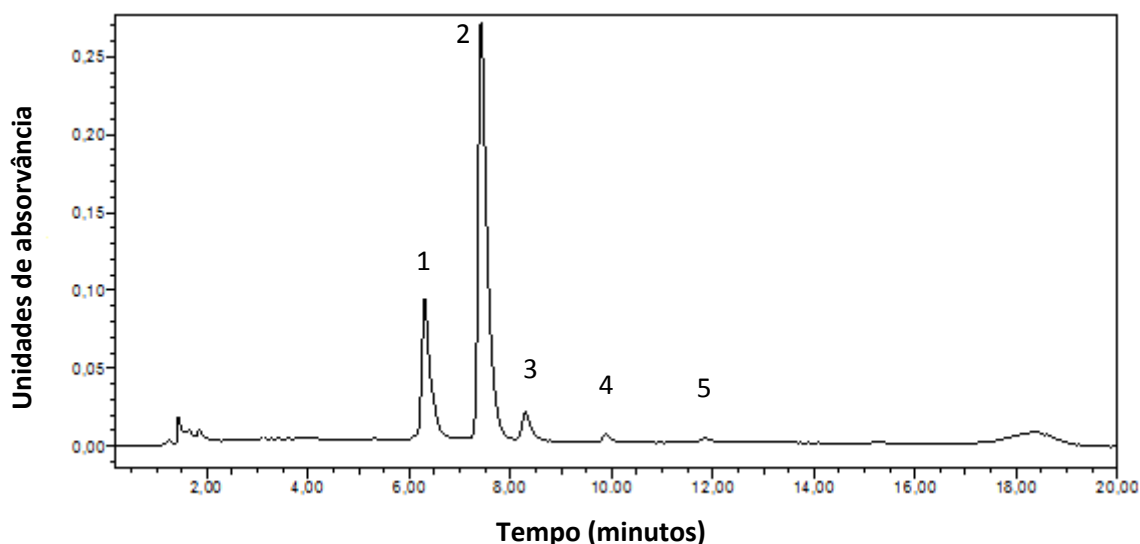
LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

n=2

Para todas as amostras, as concentrações de sacarose permaneceram abaixo do limite de detecção do método utilizado (Não detectado - ND). Quanto aos resultados de frutose e glicose, as amostras LA e LP não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo de todo o período de armazenamento, ao contrário de BA, que apresentou uma diminuição com 60 dias. A bebida LC não apresentou uma tendência de comportamento. Observou-se uma ligeira redução após 30 dias, porém nos tempos 75 e 90, observou-se um aumento nos teores de glicose e frutose.

Quanto às antocianinas presentes nas bebidas com probióticos, foram encontradas: cianidina-3-*O*-glicosídeo; cianidina-3-*O*-rutinosídeo; pelargonidina-3-*O*-glicosídeo; a pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo; a cianidina-3-*O*-ramnosídeo, sendo a cianidina-3-*O*-rutinosídeo a antocianina majoritária (Ilustração 4).



**Ilustração 4:** Cromatograma de antocianinas totais nas bebidas com probióticos. Pico 1: Cianidina-3-*O*-glicosídeo; Pico 2: Cianidina-3-*O*-rutinosídeo; Pico 3: Pelargonidina-3-*O*-glicosídeo; Pico 4: Pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo; Pico 5: Cianidina-3-*O*-ramnosídeo. Condições cromatográficas: coluna Thermo Scientific C18 2,4 $\mu$ m (4,6 x 150mm); temperatura da coluna 40°C; fase móvel gradiente de ácido fórmico 5% em água/acetonitrila; fluxo de 1,0mL/min; temperatura do injetor 15°C; volume de injeção de 20  $\mu$ L.

Os teores da cianidina-3-*O*-rutinosídeo nas bebidas com probióticos ao longo da estocagem estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Cianidina-3-*O*-rutinosídeo das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a  $3,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ .

<b>Bebida</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Cianidina-3-<i>O</i>-rutinosídeo (mg/100g)</b>
Controle	0	11,73±0,35
	30	13,12±0,59
	60	11,98±0,12
	75	11,75±0,31
	90	10,90±0,62
BA	0	14,54±0,08 <sup>a</sup>
	30	12,18±0,11 <sup>b</sup>
	60	13,42±0,65 <sup>a b</sup>
	75	11,95±0,15 <sup>b</sup>
	90	10,13±0,22 <sup>c</sup>
LA	0	14,03±0,27 <sup>a</sup>
	30	11,21±0,33 <sup>b c</sup>
	60	12,03±0,22 <sup>b</sup>
	75	9,75±0,03 <sup>c</sup>
	90	11,43±0,64 <sup>b</sup>
LC	0	15,09±0,11 <sup>a</sup>
	30	12,53±0,57 <sup>b</sup>
	60	12,78±0,62 <sup>a b</sup>
	75	11,59±0,16 <sup>b</sup>
	90	11,51±0,03 <sup>b</sup>
LP	0	14,71±0,29 <sup>a</sup>
	30	13,69±0,04 <sup>b</sup>
	60	12,78±0,62 <sup>b c</sup>
	75	11,59±0,16 <sup>c</sup>
	90	11,51±0,16 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Diferentes letras sobrescritas em uma coluna para cada bebida denotam diferenças significativas durante o período de estocagem ( $p < 0,05$ ).

BA: bebida com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

LA: bebida com adição de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

n=2

Observou-se uma pequena diminuição no teor da cianidina-3-*O*-rutinosídeo ( $p < 0,05$ ) nas quatro amostras após 30 dias de armazenamento.

Os parâmetros de cor instrumental  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  estão descritos na Tabela 10. O  $\Delta E^*$  foi calculado em comparação com a amostra controle após o processamento.



**Tabela 10** – Parâmetros de cor instrumental das bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a  $3,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ .

Bebida	Tempo (dias)	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
Controle	0	29,04±0,00	6,76±0,00	0,42±0,00	-
	30	29,33±0,18	6,64±0,07	0,05±0,02	-
	60	29,75±0,03	6,55±0,05	0,03±0,01	-
	75	29,50±0,05	6,76±0,08	0,05±0,04	-
	90	29,35±0,09	6,58±0,10	0,05±0,02	-
BA	0	28,18±0,27 <sup>a</sup>	6,00±0,10 <sup>a</sup>	0,19±0,09 <sup>a b</sup>	1,18
	30	29,30±0,05 <sup>b</sup>	6,70±0,26 <sup>b</sup>	0,14±0,06 <sup>a b</sup>	0,39
	60	29,65±0,11 <sup>c d e</sup>	6,74±0,06 <sup>b</sup>	0,06±0,01 <sup>b</sup>	0,71
	75	29,79±0,22 <sup>d e</sup>	6,75±0,17 <sup>b</sup>	0,06±0,06 <sup>b</sup>	0,83
	90	29,68±0,16 <sup>c d e</sup>	6,90±0,02 <sup>b</sup>	0,09±0,03 <sup>b</sup>	0,74
LA	0	29,02±0,12 <sup>a</sup>	6,65±0,12 <sup>a b</sup>	0,16±0,07 <sup>a b</sup>	0,29
	30	29,15±0,11 <sup>a</sup>	6,55±0,03 <sup>b</sup>	0,11±0,07 <sup>a b</sup>	0,39
	60	29,89±0,11 <sup>b</sup>	6,79±0,05 <sup>a b</sup>	0,09±0,06 <sup>b</sup>	0,86
	75	29,77±0,32 <sup>b c</sup>	6,89±0,25 <sup>a</sup>	0,18±0,08 <sup>b</sup>	0,78
	90	29,72±0,16 <sup>b c d</sup>	6,63±0,13 <sup>a b</sup>	0,11±0,03 <sup>b</sup>	0,76
LC	0	28,91±0,38 <sup>a b</sup>	6,86±0,12 <sup>a b</sup>	0,33±0,19 <sup>a b</sup>	0,19
	30	29,05±0,21 <sup>b c d</sup>	6,65±0,09 <sup>a b c d</sup>	0,24±0,06 <sup>a b c d</sup>	0,22
	60	28,53±0,12 <sup>a e</sup>	6,64±0,23 <sup>a b c d</sup>	0,26±0,07 <sup>a b c</sup>	0,55
	75	29,47±0,17 <sup>c d e</sup>	6,79±0,14 <sup>a b</sup>	0,12±0,15 <sup>c d e</sup>	0,52
	90	28,93±0,21 <sup>a b</sup>	6,37±0,18 <sup>d e</sup>	0,12±0,07 <sup>c d e</sup>	0,51
LP	0	29,16±0,18 <sup>a b c d</sup>	6,45±0,10 <sup>a b c</sup>	0,20±0,14 <sup>a b</sup>	0,40
	30	29,15±0,13 <sup>a b c d</sup>	6,20±0,02 <sup>c d</sup>	0,17±0,04 <sup>a b</sup>	0,63
	60	29,75±0,15 <sup>e f g</sup>	6,82±0,06 <sup>e f</sup>	0,06±0,06 <sup>b</sup>	0,80
	75	29,52±0,14 <sup>d e f g</sup>	6,56±0,08 <sup>a b e</sup>	0,10±0,04 <sup>b</sup>	0,61
	90	27,13±0,15 <sup>h</sup>	7,76±0,07 <sup>g</sup>	0,08±0,05 <sup>b c d</sup>	2,18

<sup>a-h</sup> Diferentes letras sobrescritas em uma coluna para cada bebida denotam diferenças significativas durante o período de estocagem ( $p < 0,05$ ).

BA: bebida com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

LA: bebida com adição de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

n=4

A análise estatística evidenciou que, ao longo dos 90 dias de armazenamento, as bebidas apresentaram diferenças significativas no parâmetro L\*: CO e BA a partir de 30 dias; LA e LP a partir de 60 dias e LC apenas com 75 dias. No parâmetro a\*, BA (a partir de 30 dias), LC (90 dias) e LP (60 e 90 dias) apresentaram diferenças significativas. Já no parâmetro b\*, apenas as bebidas CO (a partir de 30 dias) e LC (a partir de 75 dias) indicaram diferenças significativas.

Para todas as bebidas, os valores de L\* próximos a 30 (escala preto-branco) indicaram baixa luminosidade; a\* próximo a 6 (escala verde-vermelho) indicou predomínio de cor vermelha, e o parâmetro b\* próximo ao 0 (escala azul-amarelo) indicou um tom intermediário

entre o azul e o amarelo. Com relação aos valores de  $\Delta E^*$  obtidos, todas as bebidas com probióticos não fermentadas apresentaram  $\Delta E^* < 2$ , em comparação com a bebida controle, a exceção de LP com 90 dias ( $\Delta E^* = 2,18$ ).

Para a análise sensorial das bebidas, os parâmetros avaliados no teste da diferença do controle foram a aparência, o sabor e a consistência. A frequência das respostas dos avaliadores está descrita na Tabela 11.

**Tabela 11** – Frequência de avaliações sensoriais das bebidas com probióticos em comparação com a bebida controle.

<b>Bebida</b>	<b>Indicativo</b>	<b>Aparência</b>	<b>Sabor</b>	<b>Consistência</b>
BA	IGUAL	8	0	7
	LIGEIRAMENTE DIFERENTE	0	2	1
	MODERADAMENTE DIFERENTE	0	6	0
	MUITO DIFERENTE	0	0	0
	EXTREMAMENTE DIFERENTE	0	0	0
LA	IGUAL	8	2	4
	LIGEIRAMENTE DIFERENTE	0	3	2
	MODERADAMENTE DIFERENTE	0	3	2
	MUITO DIFERENTE	0	0	0
	EXTREMAMENTE DIFERENTE	0	0	0
LC	IGUAL	6	3	6
	LIGEIRAMENTE DIFERENTE	2	4	2
	MODERADAMENTE DIFERENTE	0	1	0
	MUITO DIFERENTE	0	0	0
	EXTREMAMENTE DIFERENTE	0	0	0
LP	IGUAL	8	1	6
	LIGEIRAMENTE DIFERENTE	0	2	2
	MODERADAMENTE DIFERENTE	0	5	0
	MUITO DIFERENTE	0	0	0
	EXTREMAMENTE DIFERENTE	0	0	0

n=8

BA: bebida com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

LA: bebida com adição de *Lactobacillus acidophilus* LA-5

LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

Para todos os parâmetros, nenhuma das bebidas foi avaliada com os indicativos MUITO DIFERENTE E EXTREMAMENTE DIFERENTE em relação à bebida controle. No atributo aparência, todas as bebidas foram avaliadas como IGUAL pelos avaliadores, a exceção de LC, que recebeu duas respostas LIGEIRAMENTE DIFERENTE. Para o sabor, a amostra BA apresentou o maior número de avaliadores com avaliação MODERADAMENTE DIFERENTE (6), seguida de LP (5), LA (3) e LC (1). Já para o parâmetro consistência, apenas LA recebeu avaliação MODERADAMENTE DIFERENTE (dois avaliadores).

No teste de Dunnett, os resultados da análise sensorial indicaram que nos atributos aparência e consistência nenhuma das formulações com 90 dias de armazenamento diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação à bebida controle. No entanto, quanto ao sabor, a amostra BA apresentou diferença significativa em relação ao controle.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DAS CULTURAS PROBIÓTICAS AO TRATO GASTROINTESTINAL

As bebidas com adição de *Lactobacillus casei* BGP93 e *Lactobacillus plantarum* CNPC003 foram submetidas ao ensaio *in vitro* das condições do trato gastrointestinal. Os resultados da sobrevivência dos probióticos podem ser visualizados na Tabela 12.

**Tabela 12** – Sobrevivência dos probióticos nas bebidas com probióticos durante 90 dias de armazenamento a  $3,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$  ao ensaio *in vitro* das condições do trato gastrointestinal.

Bebida	Tempo (dias)	População antes do ensaio (log UFC/mL)	População Fase gástrica (log UFC/mL)	População Fase entérica I (log UFC/mL)	População Fase entérica II (log UFC/mL)
LC	30	7,6±0,01	4,3±0,01	<4,0±0,00	<4,0±0,00
	60	7,3±0,04	<1,0±0,00	1,3±0,01	1,9±0,01
	90	6,5±0,01	<1,0±0,00	<1,0±0,00	<1,0±0,00
LP	30	7,9±0,06	6,7±0,10	6,6±0,07	6,4±0,21
	60	8,1±0,01	3,9±0,01	3,7±0,01	3,9±0,01
	90	7,8±0,02	2,0±0,01	2,4±0,04	1,8±0,21

n=2

LC: bebida com adição de *Lactobacillus casei* BGP93

LP: bebida com adição de *Lactobacillus plantarum* CNPC003

A população de *Lactobacillus casei* presente na bebida LC armazenada por 30 dias reduziu sofreu uma redução significativa a partir da fase gástrica. O mesmo padrão foi

seguido com 60 e 90 dias. No entanto, com 60 dias, houve um aumento da viabilidade nas fases entéricas.

Já o *Lactobacillus plantarum* da bebida LP armazenada por 30 dias teve uma pequena redução durante todas as fases da simulação da digestão. Para a bebida armazenada por 60 dias, houve uma redução populacional maior que 4 log já na fase gástrica. Na bebida LP armazenada por 90 dias, a redução populacional encontrada ao final da digestão *in vitro* foi de 6 log.

## 6 DISCUSSÃO

As contagens de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. nas bebidas formuladas foram realizadas com o objetivo de acompanhar a viabilidade das culturas probióticas (Tabela 6). Os resultados encontrados no tempo zero evidenciaram que o procedimento de produção dos inóculos foi eficiente para obtenção de bebidas com probióticos com população mínima de 8 log UFC/porção de 200 mL. Os resultados negativos da viabilidade probiótica na amostra controle indicaram que não houve contaminações cruzadas entre as diferentes cepas probióticas.

A avaliação da viabilidade probiótica ao longo da estocagem refrigerada sugere que a matriz mista escolhida (40% banana, 40% morango e 20% juçara) foi melhor tolerada pelas bactérias do gênero *Lactobacillus* spp., em comparação com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, já que, com apenas 30 dias de armazenamento, a bebida BA apresentou a redução da contagem de probióticos mais significativa.

Comparando as diferentes espécies de *Lactobacillus* spp. utilizadas, o uso desta matriz pode ter desfavorecido a adaptação da cepa de *L. acidophilus*, já que a bebida LA também apresentou uma redução significativa em sua viabilidade probiótica, ao final do armazenamento.

Autores relatam a importância da escolha do substrato para a formulação de um alimento probiótico. Segundo Espírito Santo e colaboradores (2010), a adição de polpa de açaí (*Euterpe oleraceae* Martius – fruto de mesmo gênero que a juçara) em leites fermentados favoreceu o desenvolvimento de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *B. longum*, durante quatro semanas de estocagem sob refrigeração. Almeida e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes com *L. acidophilus* e *B. bifidum*.

No entanto, Vinderola e colaboradores (2002) demonstraram que a utilização de suco de morango inibiu o crescimento de diversas cepas probióticas, com exceção do *L. casei*.

A adição de polpa de banana em leites fermentados também não favoreceu o crescimento de *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. (BAKIRCI, KAVAZ, 2008).

Desta forma, o uso das polpas de morango e banana nas bebidas desenvolvidas pode ter desfavorecido a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e favorecido o *L. casei*.

Já para o *L. plantarum*, o uso de matrizes vegetais para a formulação das bebidas pode ter favorecido sua estabilidade. Esta espécie é conhecida por sua capacidade de adaptação a diversos tipos de ecossistemas (BOEKHORST *et al.*, 2014) e utilização de vegetais como substrato (PEDERSON *et al.*, 1957).

Além disso, a temperatura de estocagem é também um fator importante no que diz respeito à manutenção da atividade probiótica (SILVA *et al.*, 2017). Alimentos probióticos devem ser preferencialmente estocados entre 4 e 5 °C (TRIPATHI, GIRI, 2014).

No caso da bebida BA, a baixa concentração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 já nos primeiros 30 dias pode ser explicada pela baixa resistência das bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp. a baixas temperaturas, sendo recomendada sua estocagem a 8 °C (TRIPATHI, GIRI, 2014). Alguns estudos citados por Tripathi e Giri (2014) evidenciaram uma maior adaptação de cepas de *Lactobacillus* spp. a temperaturas de 2 °C, favorecendo a viabilidade probiótica dos lactobacilos das bebidas LA, LC e LP e desfavorecendo a bifidobactéria da bebida BA na temperatura registrada de  $3,8 \pm 0,6$  °C .

Além disso, fatores como alterações de pH, oxigênio dissolvido e potencial de oxirredução afetam a viabilidade das culturas (SILVA *et al.*, 2017). Alguns autores sugerem que as cepas de *Bifidobacterium* spp. são mais sensíveis a estas variações, desfavorecendo a viabilidade probiótica da bebida BA. Bolduc e colaboradores (2006) sugerem que a utilização de desaeração e de agentes redutores que reduzam a taxa de oxigênio podem ser utilizados para melhorar a sobrevivência de bifidobactérias em leites durante estocagens longas a frio.

Sendra e colaboradores (2008), utilizando suplementação de limão em leites fermentados, observaram aumento das contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei*, e redução de *Bifidobacterium bifidum*, devido a diminuição do pH.

A presença de taninos nas matrizes utilizadas como substrato também pode influenciar na viabilidade da bactéria probiótica. Punicalaginas, punicalinas e ácido elágico presentes em suco de romã inibiram *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BIALONSKA *et al.*, 2009). O ácido elágico presente na polpa de morango (CASSANI *et al.*, 2018) pode ter desfavorecido a viabilidade das bifidobactérias da bebida BA.

Com relação à avaliação microbiológica, as baixas contagens de bolores e leveduras, coliformes a 45 °C e a ausência de *Salmonella* spp. indicaram que não houve deterioração microbiológica das bebidas durante o armazenamento e que houve um bom controle das condições higiênico-sanitárias no processamento, estando também em acordo com a legislação (ANVISA, 2001).

O pH, a acidez e os teores de açúcares redutores podem ser importantes parâmetros para avaliar o controle da fermentação das bebidas (Tabelas 7 e 8). A produção de bebidas não fermentadas é uma estratégia importante do ponto de vista sensorial, pois os ácidos produzidos pelo metabolismo das bactérias probióticas podem gerar sabores desagradáveis aos alimentos.

As medições de pH evidenciaram que o armazenamento sob refrigeração promoveu um controle da fermentação das bebidas, pois não houve diferença significativa entre os valores obtidos nas bebidas ao longo do armazenamento.

Quanto aos açúcares redutores, apesar de terem sido observadas diferenças significativas em algumas bebidas, não houve uma tendência de redução, já que, ao longo do armazenamento, os valores tornaram a aumentar, sugerindo que não houve utilização dos açúcares para o metabolismo dos microrganismos.

Os resultados das análises de acidez evidenciaram algumas diferenças significativas para as amostras LC e LP ao longo do armazenamento.

Apesar das diferenças encontradas sugerirem a ocorrência de atividade metabólica controlada pela refrigeração nestas bebidas (LC e LP), a baixa produção de ácidos não foi suficiente para prejudicá-las sensorialmente, pois, para os parâmetros sensoriais de sabor, consistência e aparência, estas bebidas não apresentaram diferença significativa em relação à amostra controle.

Ainda com relação aos aspectos sensoriais de sabor, consistência e aparência (Tabela 11), apenas a bebida BA apresentou diferença significativa para o sabor. Bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp. possuem um metabolismo heterofermentativo, com produção de ácido acético e láctico, ao contrário da maioria dos lactobacilos, que produzem apenas ácido láctico (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que, possivelmente, uma pequena concentração de ácido acético, não percebida na análise de acidez total, produto da baixa atividade metabólica do *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, alterou as características sensoriais da bebida BA.

Na avaliação das concentrações da antocianina majoritária cianidina-3-*O*-rutinosídeo ao longo da estocagem (Tabela 9), apesar de ter havido diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para as quatro bebidas a partir de 30 dias de armazenamento, as reduções observadas não caracterizaram uma grande perda ao final da avaliação de 90 dias.

Nas análises de cor instrumental (Tabela 10), valores de  $\Delta E^*$  são utilizados para indicar diferenças de sensação na totalidade da cor e foram calculados para todas as bebidas

em comparação com a bebida controle, no tempo zero. Valores de  $\Delta E^* < 2$  indicam diferenças quase imperceptíveis e de  $\Delta E^* < 5$  indicam diferenças toleráveis. Acima de 10, o  $\Delta E^*$  indica que são cores diferentes. Os valores de  $\Delta E^* < 2$  obtidos para BA, LA e LC ao longo da estocagem evidenciaram diferenças quase imperceptíveis na cor, incluindo brilho, tom e saturação, em comparação com a bebida controle. Em LP, apenas ao final da estocagem, o valor de  $\Delta E^*$  pouco maior que 2 indicou uma diferença tolerável em relação ao controle.

Finalmente, para as análises de sobrevivência das culturas probióticas ao trato gastrointestinal realizada com as bebidas LC e LP, os resultados encontrados demonstraram que ao longo do tempo de armazenamento das bebidas, a resistência de ambas as culturas é reduzida. Além disso, observou-se que o pH ácido da fase gástrica causa injúrias às células dos microrganismos, que podem se recuperar nas fases entéricas, como ocorreu com LC aos 60 dias. No entanto, comparando as duas cepas de lactobacilos utilizadas, o *Lactobacillus plantarum* demonstrou uma melhor sobrevivência em comparação com o *L. casei* ao longo de todo o período de acompanhamento, corroborando a excelente adaptação do *L. plantarum* a diferentes substratos (BOEKHORST *et al.*, 2014) e demonstrando sua resistência a condições adversas.



## 7 CONCLUSÃO

As bebidas desenvolvidas se apresentaram como produtos com bom potencial de mercado, devido ao seu alto valor funcional agregado, que se deve aos benefícios dos probióticos sem alterações no sabor, às capacidades potencialmente funcionais das matrizes utilizadas e ao fato da formulação não conter adição de açúcares.

Nas condições estudadas, foi possível concluir que dentre as bebidas com probióticos não fermentadas produzidas a partir da matriz mista de banana, morango e juçara e cepas probióticas e armazenadas durante 90 dias em temperatura de refrigeração, as formulações com *Lactobacillus casei* BGP93 e *Lactobacillus plantarum* CNPC003 apresentaram concentrações acima do padrão utilizado pela indústria para ser considerada um produto com probiótico, e redução menor que 2 log UFC/mL, durante todo o período de armazenamento.

A formulação com *Lactobacillus acidophilus* La-5 apresentou estas concentrações por 60 dias de armazenamento e a formulação com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* apresentou uma redução acentuada, ficando abaixo deste padrão ainda com 30 dias.

Os resultados indicaram ainda que a refrigeração pode ser empregada no controle da fermentação e nas estabilidades físico-química, microbiológica e sensorial das bebidas desenvolvidas por até 90 dias, com exceção da bebida que continha a bifidobactéria, que mostrou alterações quanto ao sabor, quando comparada ao padrão (bebida sem probióticos) nos testes sensoriais.

Quando submetidas às análises de sobrevivência à simulação *in vitro* das condições do trato gastrointestinal, as cepas de *Lactobacillus casei* BGP93 e *Lactobacillus plantarum* CNPC003 demonstraram melhor sobrevivência quanto menor o tempo de armazenamento. Os resultados também ressaltaram que o *L. plantarum* possui melhor adaptação ao substrato vegetal utilizado como matriz para o desenvolvimento das bebidas e melhor resistência à digestão, quando comparado ao *L. casei*, já que o *L. plantarum* apresentou 8 log UFC/200 mL até 30 dias de armazenamento.

As populações de cerca de 2 log UFC/mL obtidas ao final da simulação por até 60 dias para o *L. casei* e por até 90 dias para o *L. plantarum* poderão colonizar o intestino e se reproduzir.

## 8 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

As diferentes formas de adaptação e sobrevivência dos microrganismos à matriz de origem vegetal utilizada neste trabalho sugerem que outras cepas probióticas com propriedades potencialmente benéficas, como *Saccharomyces boulardii*, possam ser testadas.

No entanto, a bebida com *Lactobacillus plantarum* poderá ser testada ainda quanto a sua capacidade antioxidante, e testes *in vivo*, que comprovem os efeitos funcionais da modulação intestinal pelo probiótico, além de pesquisas de mercado e aceitação sensorial.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO 6579:2014: Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal — Método horizontal para a detecção de *Salmonella* spp.

ALMEIDA, M. H. B *et al.* Potentially probiotic açai yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 2, p. 178-182, 2008.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2015. Ed Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância sanitária: Alimentos com alegação de propriedades funcionais ou saúde. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>, atualizado em 22/12/2016. Acesso em: 04 Jun/2018.

AOAC – Association of Official analytical Chemists, 20 ed., 2016.

AOCS Official Procedure, Approved Procedure Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. American Oil Chemists Society, Urbana, IL, 2005.

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 2, p. 78-91, 2009.

BAKIRCI, Ihsan; KAVAZ, Arzu. An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT2 starter culture during storage. **International journal of dairy technology**, v. 61, n. 3, p. 270-276, 2008.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M.I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food microbiology**, v. 34, n. 2, p. 382-389, 2013.

BEDANI, R. *et al.* Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 436-443, 2014.

BIALONSKA, Dobrosława *et al.* The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8344-8349, 2009.

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of Juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant foods for human nutrition**, v. 69, n. 2, p. 142-147, 2014.

BOEKHORST, J. *et al.* The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* reveal extensive differences in chromosome organization and gene content. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3601-3611, 2004.

BOLDUC, Marie-Pierre *et al.* Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1038-1048, 2006.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2, p. 121-129, 2010.

Cassani, L.; Gerbino; E., Moreira; M. del R.; Gómez-Zavaglia, A. Influence of non-thermal processing and storage conditions on the release of health-related compounds after *in vitro* gastrointestinal digestion of fiber-enriched strawberry juices. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 128–136, 2018.

CIE Commission International de l'Eclairage. Recommendations on Uniform Color Spaces, Color Difference Equations, Psychometric Color Terms. Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris, 1978.

CIQUAL e CNEVA Répertoire général des aliments. In: Table de composition des fruits exotiques de cueillette d'Afrique, Vol. 1. France: ORSTOM Editions/Tec & Doc Lavoisier/INRA Editions. p. 8 e 12, 1993.

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods. APHA: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 5<sup>a</sup> Edição, 2015.

DE LIMA, M. S. F. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An *in vitro* evaluation of probiotic properties. **Microbial Pathogenesis**, 2017.

DE OLIVEIRA, M. E. G. *et al.* Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food research international**, v. 64, p. 241-247, 2014.

DO ESPÍRITO SANTO, A. P. *et al.* Influence of food matrices on probiotic viability—A review focusing on the fruity bases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 7, p. 377-385, 2011.

FAO & WHO: Food and Agriculture Organization of The United Nations; World Health Organization. Probiotics in food - health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 09 Set/2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). FAOSTAT. FAO Statistics Division 2014. Disponível em: [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org). Acesso em: 28 Jun/2018.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y. *et al.* Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. **Research in veterinary science**, v. 108, p. 125-132, 2016.

GIAMPIERI, F. *et al.* The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9-19, 2012.

GOMES, A. M. P, MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

HAN, Q. *et al.* *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 391-400, 2017.

HOLZAPFEL, W. H. Introduction to prebiotics and probiotics. In JUNEJA, Vijay K.; GOKTEPE, Ipek; AHMEDNA, Mohamed. **Probiotics in food safety and human health**. CRC Press, 2005.

INADA, K. O. P. *et al.* Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015.

SHILS, M. E. In eds.: ME Shils, JA Olson, M. Shike and AC Ross, Magnesium. Modern Nutrition in Health and Disease, New York: Lippincott Williams and Wilkins, edn, v. 9, p. 169-192, 1999.

LISERRE, A. M.; RE, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007.

MACRAE, R. **Food Science and technology** – A series of monographys: HPLC in food analysis. Editora Academic Press, 2<sup>a</sup> ed., p.77, 1998.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6, p. 921-927, 2005.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011.

MARTINEZ, R. C. R. *et al.* Characterization and evaluation of *Lactobacillus plantarum* probiotic potential. In: *Lactobacillus: Classification, uses and health implications*, 2012.

MATIAS, N. S. *et al.* In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International journal of food microbiology**, v. 234, p. 83-93, 2016.

MULER, A. E. *et al.* Can overharvesting of a non-timber-forest-product change the regeneration dynamics of a tropical rainforest? The case study of *Euterpe edulis*. **Forest ecology and management**, v. 324, p. 117-125, 2014.

MULLER, J. A. *et al.* Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 4, p. 1369-1379, 2010.

OLIVEIRA, D. *et al.* Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 234-241, 2017.

OLIVEIRA, M. I. S. *et al.* Estabilidade da polpa de morango atomizada utilizando diferentes agentes carreadores. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 4, p. 310, 2013.

PEDERSON, C. S. G. I. *Lacobacillus Bejerinck*. 1901. **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**, 7th ed.: Breed, RS, Murray, EGD and Smith, NR (Eds), Williams and Wilkins Co.: Baltimore, MD, v. 542, 1957.

RIBEIRO, L. O. *et al.* Sensory evaluation and antioxidant capacity as quality parameters in the development of a banana, strawberry and juçara smoothie. **Food Science and Technology**, 2017.

RIBEIRO, L. O.; MENDES, M. F.; PEREIRA, C. S. S. Avaliação da composição centesimal, mineral e teor de antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Eletrônica TECCEN, Vassouras**, v. 4, n. 2, p. 5-16, 2011.

RESOLUÇÃO-RDC ANVISA: Agência Nacional de Vigilância sanitária, nº 12, de 2 de Janeiro de 2001.

RESOLUÇÃO-RDC ANVISA: Agência Nacional de Vigilância sanitária, nº 2, de 7 de Janeiro de 2002.

SAITO, V. S. T. *et al.* Viability and resistance of *lactobacilli* isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. **Journal of food science**, v. 79, n. 2, 2014.

SANTIAGO, M. C. P. A. *et al.* Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí. **Comunicado Técnico, Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, 2010.

SAXELIN, Maija *et al.* Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 204-211, 2005.

SENDRA, Esther *et al.* Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food microbiology**, v. 25, n. 1, p. 13-21, 2008. SCI-NEWS. Disponível em <http://www.sci-news.com/medicine/lactobacilli-depression-symptoms-04687.html>. Acesso em: 05 Set/2017.

SCHULZ, M. *et al.* Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125-131, 2015.

SCHULZ, M. *et al.* Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.



SERAVALLI, E. P.; RIBEIRO, E. P. Química de alimentos. São Paulo, SP. **Instituto Mauá de Tecnologia**, Edgard Blucher, 2004.

SILVA, M. P. *et al.* Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 640-647, 2017.

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.

SHORI, A. B. Microencapsulation Improves Probiotics Survival During Gastric Transit. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, p. 1-5, 2017.

STONE, H; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Academic Press, p 338, 1993.

SUCCI, M. *et al.* Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static *in vitro* digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 60-67, 2017.

TACO, N. Tabela brasileira de composição de alimentos. **Revista Ampliada NEPA UNICAMP**, 2011.

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.

US Department of Agriculture, Agriculture Research Service. USDA national nutrient for standard references, release 23. Fruits and fruit juices; 2010, p. 785–787.

WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Amer Inst for Cancer Research, 2007.

VINDEROLA, C. G. *et al.* Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 7, p. 579-589, 2002.

VINDEROLA, G. *et al.* 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.

# APÊNDICE 1

Teste sensorial das bebidas com probióticos no programa Fizzterm 0.

Fizzterm 0

Você está recebendo amostras de smoothie de juçara, banana e morango para comparar cada uma com a Referência marcada com R. Indique, para cada atributo, se a amostra é IGUAL OU DIFERENTE da Referência R.

**APARÊNCIA**

Igual  Ligeiramente diferente  Moderadamente diferente  Muito diferente  Extremamente diferente

**SABOR**

Igual  Ligeiramente diferente  Moderadamente diferente  Muito diferente  Extremamente diferente

**CONSISTÊNCIA**

Igual  Ligeiramente diferente  Moderadamente diferente  Muito diferente  Extremamente diferente

196

Próxima página