

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

RODOLFO SHON DE SOUZA

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA SABOR MANGA E UVA  
COM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS***

PROJETO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA  
2014

RODOLFO SHON DE SOUZA

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA SABOR MANGA E UVA  
COM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto Maia

Coorientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marly Sayuri Katsuda

LONDRINA  
2014

## TERMO DE APROVAÇÃO

ELABORAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA SABOR MANGA E UVA COM  
*LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

RODOLFO SHON DE SOUZA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 28 de Julho de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinado. Após a deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Luciana Furlaneto Maia  
Prof.(a) Orientador(a)

---

Margarida Masami Yamaguchi  
Membro titular

---

Marly Sayuri Katsuda  
Membro titular

## **AGRADECIMENTOS**

Certamente esses parágrafos não serão suficientes para que eu possa agradecer a todos que me acompanharam durante essa etapa da minha vida. Portanto, desde já peço desculpas a aqueles que não estão aqui presentes, mas tenham certeza que vocês fazem parte de minha gratidão.

Agradeço primeiramente a minha mãe por todo sacrifício que fez para que eu me tornasse um bom homem.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto Maia por todo conhecimento que me passou durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

A mestre em microbiologia, Márcia Terra por todo apoio durante os ensaios laboratoriais. Aos meus amigos mais próximos que sempre estiveram ao meu lado.

Aos professores que tive durante a graduação, que me passaram toda a sabedoria necessária para que eu me tornar-se um bom profissional.

E por fim, deixo o meu agradecimento a todos de que alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

## RESUMO

SHON, Rodolfo S. **Elaboração de bebida probiótica sabor manga e uva com *Lactobacillus acidophilus***. 2014. 24f. Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2012.

Os alimentos funcionais conferem vários benefícios à saúde do consumidor, além dos nutrientes básicos necessários para uma boa alimentação. Nesse contexto, destacam-se os probióticos que são micro-organismos que ao serem ingeridos conferem vários benefícios ao organismo humano, principalmente ao trato gastrointestinal. Os probióticos possuem sua aplicabilidade ainda muito restrita para a indústria de laticínio, o que faz com que seu consumo seja limitado, pois algumas pessoas não podem ou não apreciam consumir produtos lácteos. Assim, esse trabalho teve como objetivo, elaborar uma bebida probiótica com *Lactobacillus acidophilus* a partir do suco de manga e uva. Foram utilizados os sucos de manga e uva, sem adição de conservantes, onde a cultura da bactéria *L. acidophilus* foi inoculada permanecendo em fermentação por 24 horas a 37°C. O desenvolvimento microbiano e o pH do suco foram determinados a cada duas horas, nas primeiras 6 horas e após 10 e 15 dias de fermentação. Como resultado no suco de manga obteve-se crescimento celular até o tempo de 6 horas, com consumo de açúcar e pouca alteração no pH. Aos 15 dias a viabilidade celular decresceu. Já os resultados obtidos no suco de uva, no tempo de 6 horas a viabilidade celular já havia decrescido com consumo de açúcares e alteração do pH. Conclui-se que dependendo do tipo de fruta e demais fatores, o crescimento do *L. acidophilus* foi diferente em ambos os sucos, porém, demonstra um potencial para o desenvolvimento de sucos de frutas contendo probióticos.

**Palavras-chave:** Probiótico. *Lactobacillus acidophilus*. Alimentos funcionais. Suco de manga e uva. Fermentação.

## ABSTRACT

SHON, Rodolfo S. **Development of Probiotic Drink of mango and grape with *Lactobacillus acidophilus***. 2014. 24p. Completion of course work (Food Technology) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2014.

Functional foods provide several health benefits to the consumer, beyond the basic nutrients needed for good nutrition. In this context, we highlight that probiotics are microorganisms that, when ingested deliver several benefits to the human body, particularly the gastrointestinal tract. Probiotic's application is restricted to the dairy industry, and its use is limited because some people are either lactose intolerant or they simply don't enjoy eating dairy products. This study aimed to develop a probiotic drink with *Lactobacillus acidophilus* from mango juice and grape. Mango and grape's juices are preservative free and the culture of *L. acidophilus* bacterium was inoculated in fermentation remained there for 24 hours at 37 ° C. Between 10 and 15 days after fermentation, the microbial growth and the acidic levels of the juice were determined every two hours during the first 6 hours. At T6 hours, the cell growth from the mango juice was obtained with little changes to the sugar consumption and acidic levels. At T15 days, the cell viability decreased. For the grape juice, the result obtained during the T6 hours showed decreased in cell viability and changes to both sugar consumption and acidity levels. In conclusion, depending on the type of fruit and other factors, the growth of *L. acidophilus* yielding different results, showing the potential for the development of fruit juices containing probiotic.

**Keywords:** Probiotics. *Lactobacillus acidophilus*. Functional foods. Mango juice and grape. Fermentation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 – Aspecto Colonial de <i>Lactobacillus acidophilus</i> em meio ágar MRS.....	10
Figura 2 - Gráfico Crescimento do probiótico e alteração de pH no suco de Manga e Uva.....	16
Figura 3 – Sucos Probióticos Fermentados, Manga (A) e Uva (B).....	19
Tabela 1 – Teor de açúcares nos sucos probióticos.....	20

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	6
2.1 OBJETIVO GERAL .....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
<b>3 PROBIÓTICO</b> .....	7
3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	7
3.2 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	8
3.3 OS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS .....	9
3.3.1 Efeitos benéficos dos probióticos e consumo .....	11
3.4 PROBIÓTICOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS .....	12
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E SUCO DE FRUTAS .....	14
4.2 MÉTODOS .....	14
4.2.1 Reativação do probiótico .....	14
4.2.2 Elaboração dos sucos .....	15
4.2.3 Determinação do crescimento microbiano durante a fermentação .....	15
4.2.4 Verificação da viabilidade celular sob refrigeração .....	15
4.2.5 Análise do pH .....	16
4.2.6 Análise do °Brix .....	16
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23



## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são vistos como uma nova fonte de consumo de alimentos saudáveis que conferem benefícios à saúde do consumidor e trazem inovações comparadas aos alimentos convencionais. Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os que possuem cultura probiótica, ou seja, micro-organismos que consumidos e administrados na quantidade adequada, agem no trato gastrointestinal afetando positivamente a saúde do hospedeiro (MORAES; COLLA, 2006).

Os probióticos fornecem diversos efeitos benéficos ao consumidor tais como: redução de colesterol, redução de intolerância a lactose, regulação da flora intestinal, melhora do sistema imunológico, inibição de patógenos, melhor absorção de minerais e produção de vitaminas. Para obter esses benefícios, os probióticos devem ser consumidos diariamente e associados a hábitos de alimentação saudável (COELHO, 2009; OLIVEIRA et al. 2002<sup>a</sup>).

Entre vários micro-organismos considerados probióticos destaca-se o grupo *Lactobacillus*, pois são de grande importância para a indústria de alimentos sendo muito utilizados em produtos de derivados lácteos como iogurtes e queijos (BADARÓ et al. 2008).

Os probióticos ainda possuem sua aplicabilidade muito limitada à indústria de laticínios, sendo a retentora de grande parte do mercado de alimentos funcionais, e é de fundamental importância o desenvolvimento de novos produtos adicionados dessas culturas para a ampliação desse mercado e aceitação por novos consumidores, pois não são todos que podem ou apreciam produtos lácteos (COELHO, 2009).

Desta forma, este trabalho buscou elaborar um alimento probiótico a partir do suco de manga e uva, adicionados de *Lactobacillus acidophilus*, verificando a capacidade de crescimento da cultura em um meio não lácteo e o potencial do uso de alimentos vegetais como fonte para o desenvolvimento de novos produtos acrescidos com esses micro-organismos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar um alimento probiótico a partir do suco de manga e uva adicionado com *Lactobacillus acidophilus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os sucos de frutas adicionados com probiótico *L. acidophilus*;
- Verificar o crescimento do micro-organismo em cada formulação de suco;
- Averiguar as mudanças de pH e °Brix

### 3 PROBIÓTICO

#### 3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos que além de fornecerem um valor nutritivo, oferecem vários benefícios á saúde podendo desempenhar um papel benéfico na redução do risco de doenças crônicas (MORAES; COLLA, 2006).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que afete positivamente o bem-estar e a manutenção da saúde do consumidor e reduza o risco a doenças (MORAES; COLLA, 2006).

Atualmente os alimentos funcionais são vistos como uma imagem positiva pelos consumidores, pelo fato de fornecerem benefícios á saúde sendo considerados novo caminho para uma alimentação saudável. Além disso, representam inovação comparada aos alimentos convencionais (COELHO, 2009).

São vários os benefícios fornecidos por esses alimentos como, redução da pressão arterial, do colesterol, anti-carcinogênicos, combate a problemas cardíacos, redução de agentes infecciosos pelo consumo de probióticos, estímulo da motilidade intestinal e melhor absorção da lactose. O objetivo primário dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação. (OLIVEIRA; ALERGO; SAAD, 2002).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em várias áreas do organismo como no sistema gastrointestinal, cardiovascular, no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (MORAES; COLLA, 2006).

O interesse no desenvolvimento de alimentos e bebidas funcionais tem aumentado para melhorar a saúde e bem-estar dos consumidores, principalmente aqueles que trazem benefícios ao intestino sendo fontes de micro-organismos

probióticos, dominando o mercado de alimentos funcionais (COELHO, 2009).

### 3.2 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL

A mucosa intestinal de um adulto contém bilhões de micro-organismos com aproximadamente 500 espécies existentes, e a maioria sendo anaeróbias. O estômago e o intestino delgado são ambientes desfavoráveis para a colonização bacteriana devido a ação bactericida do suco gástrico e o intenso peristaltismo do intestino delgado, sendo o cólon o local onde as bactérias encontram um ambiente favorável para sua proliferação devido á ausência dos fatores presentes no estômago e intestino delgado, além de um abundante suprimento nutricional (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006; COELHO, 2009).

A microbiota intestinal apresenta várias funções positivas como ação antibacteriana, imunomoduladora e metabólica/nutricional. As funções antibacterianas são caracterizadas pela competição de sítios de adesão onde as bactérias presentes na microbiota impedem o estabelecimento de patógenos ou até mesmo pela produção de substâncias antimicrobianas. A função imunomoduladora onde os micro-organismos interagem com as células epiteliais estimulando a produção de células de defesa e o desenvolvimento do sistema imunológico (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). No que diz respeito às funções metabólicas/nutricionais, estão relacionadas pelo processo de fermentação, onde as bactérias do intestino metabolizam vários substratos (principalmente componentes dietéticos) formando produtos finais como ácidos graxos de cadeia curta, gases, produção de vitamina K e B12 (OLIVEIRA et al. 2002<sup>a</sup>; COELHO, 2009).

Portanto, os probióticos são responsáveis por muitas ações benéficas no sistema gastrointestinal, sendo capazes de otimizar a microbiota e protegendo-a de doenças causadas por patógenos (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). Dessa forma, a microbiota intestinal é responsável por várias reações bioquímicas que interferem no equilíbrio microbiológico do sistema evitando a proliferação de micro-organismos patogênicos e impactando na saúde e bem-estar do hospedeiro (COELHO, 2009)

### 3.3 OS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS

Segundo Oliveira et al. (2002<sup>a</sup>), os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando são consumidos e administrados na quantidade adequada, agem no trato gastrointestinal afetando positivamente a saúde do hospedeiro.

São vários os critérios para que um micro-organismo seja empregado como probiótico: não apresentar patogenicidade, ser Gram-positivo, ser produtor de ácido láctico e ácido resistente, apresentar especificidade ao hospedeiro, apresentar excreção de fator anti-*E.coli*, ser resistente a bile, ser geneticamente estável, possuir características de aderência e colonização, produção de substâncias antimicrobianas, capacidade de competição com a microbiota normal e ser viável/estável (BADARÓ et al. 2008).

Oliveira et al. (2002<sup>a</sup>), enumeraram três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis mediante produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes que seria a alteração do metabolismo microbiano, e a competição por sítios de adesão causando o estímulo da imunidade do hospedeiro, aumentando os níveis de anticorpos.

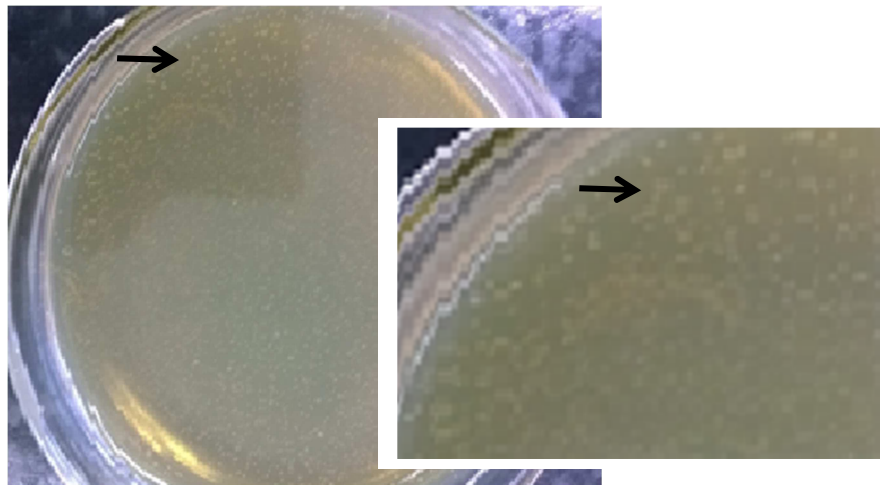
Entre os vários micro-organismos considerados probióticos estão os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* pois são os gêneros que tem sido mais isolados da porção do trato gastrointestinal de um humano saudável (COELHO, 2009). Mas Coppola; Turnes, (2004) comentam que também podemos considerar os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium* como espécies probióticas.

Segundo Buriti; Saad, (2007) as espécies *L. casei*, *L. Paracasei*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* são de grande importância para a indústria de laticínios, devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e na fabricação de queijos para a melhoria de sua qualidade.

De acordo com Coelho (2009) e Buriti; Saad (2007) o gênero *Lactobacillus* são micro-organismos Gram-positivos, não esporulados, em forma bacilar ou cocobacilar, aerotolerantes, ácido-tolerantes, desprovidos de flagelos e estritamente fermentativos sendo o ácido láctico o produto final da degradação de carboidratos. O

pH ótimo de crescimento está na faixa de 5,5 a 6,0 e temperatura ótima de 35 a 40°C, mas podem crescer em temperaturas mais elevadas (até 45°C), sendo os gêneros *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* os mais empregados na indústria de alimentos (FREITAS, 2012). Os aspectos das colônias em ágar MRS são de tamanho médio e ligeiramente puntiformes, de coloração branco-âmbar (Figura1).

*Lactobacillus* são aptos a colonizar vários ambientes naturais como laticínios, produtos vegetais e alimentos deteriorados e o corpo humano como boca e trato intestinal apresentando necessidades nutricionais e fisiológicas muito similares multiplicando-se em ambientes semelhantes (BURITI; SAAD, 2007).



**Figura 1 – Aspecto colonial de *Lactobacillus acidophilus* em meio ágar MRS (seta)**

**Fonte: Autoria Própria**

Entre vários tipos de produtos alimentícios, o leite e seus derivados como iogurtes e queijos, são os meios mais populares utilizados para adição de micro-organismos probióticos (BURITI; SAAD, 2007). A fermentação causada pelo micro-organismo probiótico age para otimizar a viabilidade microbiana e produtividade do alimento e conseqüentemente preserva as propriedades probióticas e prolonga a conservação do alimento devido a acidificação do meio (BADARÓ et al. 2008).

### 3.3.1 Efeitos benéficos dos probióticos e consumo

Os probióticos são alimentos ou suplementos microbianos que podem ser utilizadas para regular o equilíbrio da flora intestinal através da re-população direta, trazendo benefícios á saúde do hospedeiro. Os probióticos são considerados bioprotetores, bioterapeuticos ou bioprolifáticos, pois concedem melhorias das propriedades da microbiota nativa (COELHO, 2009).

Oferecem inúmeros benefícios ao organismo como, redução de colesterol, redução de intolerância a lactose, o estímulo da motilidade intestinal com conseqüente alívio da constipação intestinal, melhor absorção de determinados nutrientes, função anti-tumoral, melhora do sistema imune, supressão de infecções por *Helicobacter pylori*, equilíbrio da flora intestinal e o efeito mais importante relacionado aos probióticos é o seu papel inibitório contra micro-organismos patogênicos (COELHO, 2009; OLIVEIRA et al. 2002). As bactérias probióticas podem produzir uma variedade de substâncias que dentre elas, existem alguns metabólitos que apresentam potencial inibitório tanto contra bactérias gram-positivas como gram-negativas, que reduzem não apenas o número de células viáveis dos micro-organismos patogênicos como também afetam seu metabolismo e a produção de toxinas. Dentre esses compostos antimicrobianos estão os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e antibióticos (FREITAS, 2012).

Coelho (2009) enfatiza que esses benefícios são específicos para cada cepa, e que a mesma não conseguirá apresentar sozinha os benefícios citados ao hospedeiro.

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1999), “a quantidade mínima viável do micro-organismo utilizado deve ser de  $10^6$  UFC/ml para ser definido como um alimento probiótico”. Vários autores enfatizam que a quantidade necessária de culturas probióticas varia em função da cepa utilizada e o resultado desejado, sendo a dose considerada terapêutica de 100g de produto contendo 6 a 7 log UFC/g (BURITI; SAAD, 2007).

Coelho (2009) afirma que as indústrias de alimentos adotam a recomendação diária de  $10^6$  UFC/g no momento do consumo e que esses produtos devem ser consumidos diariamente para que ocorra os efeitos dos micro-organismos probióticos na microbiota intestinal.

Nos requisitos específicos exigidos pela legislação, na documentação do produto referente à sua eficácia deve estar incluído um laudo de análise que comprove a quantidade mínima viável do probiótico até o fim do prazo de validade, teste de resistência do microrganismo à acidez estomacal e sais biliares e deve ser declarado a quantidade de probiótico em UFC contida na recomendação diária de consumo do produto elaborado (BRASIL, 1999).

No rótulo do produto ainda deve conter informações como gênero, espécie e cepa, número mínimo de probióticos viáveis até o final da validade do produto, a dose considerada efetiva para atingir as alegações à saúde, os benefícios e as condições ideais para a estocagem (COELHO, 2009).

### 3.4 PROBIÓTICOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

De acordo com Coelho (2009) os probióticos apresentam um grande potencial de uso para as indústrias de alimentos, pois competem e eliminam as bactérias patogênicas presentes no alimento. Isso se aplica até mesmo na qualidade final do alimento, no caso da elaboração de queijo adicionados com probióticos onde algumas características sensoriais são alteradas e sua viabilidade aumentada graças à capacidade de competição contra micro-organismos patógenos (BURITI; SAAD, 2007).

Para a indústria o grande desafio é manter a viabilidade desses micro-organismos durante a vida de prateleira do alimento adicionado com cultura probiótica. O desempenho das culturas também é um fato importante e pode ser avaliada de acordo com a multiplicação no alimento, estabilidade, mudanças nas propriedades sensoriais e viabilidade durante o armazenamento apresentando números elevados ( $>10^6$  UFC/ml) durante todo o período de estocagem (SAAD, 2006).

*Lactobacillus* spp se destacam pelo fato de possuírem atividade antimicrobiana contra contaminantes e deteriorantes em alimentos e tem sido muito aplicado nas indústrias de laticínios inibindo a multiplicação de patógenos como *Staphylococcus aureus*, e contribuindo para a bio-conservação dos produtos lácteos.



(BURITI; SAAD, 2007). Coelho (2009) e Saad (2006) comentam que a viabilidade das culturas probióticas nos alimentos sofre influencia de fatores como composição e formulação do alimento, as condições de estocagem e o gênero, espécie e cepa do micro-organismo adicionado no produto elaborado. É também importante dizer que a bactéria probiótica tenha condições de ser usada em escala industrial, tendo sua validade variando entre 15 e 30 dias e as características sensoriais aceitáveis (COELHO, 2009).

A indústria de laticínios é ainda a grande retentora de grande parte do mercado de alimentos funcionais, pois o consumidor procura por produtos mais saudáveis e inovadores sem perder a qualidade nutricional do alimento (THAMER; PENNA, 2006). Além disso, Coelho (2009) ressalta que os leites fermentados levam a uma ingestão de micro-organismos benéficos ao intestino por serem bactérias lácticas elas acidificam o alimento, evitando o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e melhorando o tempo de vida de prateleira do produto.

Os principais produtos hoje comercializados com adição de culturas probióticas incluem iogurtes, sobremesas a base de leite, sorvetes, leite em pó para recém-nascidos, cereais, queijos, carnes fermentadas e sucos de frutas (BURITI; SAAD, 2007).

Devido ao aumento de vegetarianos e problemas de saúde causados por alimentos derivados de animais, a procura por alimentos vegetais acrescidos com probióticos vem aumentando (COELHO, 2009; SAAD, 2006).

Os sucos de frutas podem ser um meio ideal para adição de probióticos pois são alimentos considerados saudáveis e de grande consumo por uma grande parte da população mundial, além da vantagem de não apresentarem alérgenos, como nos produtos lácteos (COELHO, 2009). Os sucos adicionados de probióticos possuem sabor diferente dos sucos convencionais, porém, apesar da mudança sensorial existe um grande interesse na produção de bebidas fortificadas com essas bactérias que podem agregar valor nesse tipo de produto (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004).

O uso dessas culturas para a elaboração de novos alimentos deve ser feito considerando a manutenção da viabilidade do micro-organismo, sem criar sabor ou qualquer outro efeito indesejável para que o produto não seja rejeitado pelos consumidores (COELHO, 2009).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E SUCO DE FRUTAS

Neste estudo foram utilizadas cepas comerciais do probiótico *Lactobacillus acidophilus*, gentilmente doadas pelo Dr Lucio A. F. Antunes (Christian Hansen®).

Os sucos de manga e uva são livres de conservantes e possuíam a adição de açúcar em sua constituição, sendo adquiridos no comércio local da cidade de Londrina-Pr.

O trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Londrina.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Reativação do probiótico

A cepa de *L. acidophilus* encontrava-se liofilizada. Para a reativação celular, uma quantidade da cultura foi adicionada em 10 mL de caldo MRS, seguido de homogeneização e incubado por 24 horas a 37 ° C.

A cultura ativada da bactéria *L. acidophilus* foi preparada, na concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL utilizando a escala de McFarland, em tubos de ensaio contendo água esterilizada e centrifugados por 15 minutos a 5.000 rpm. A massa precipitada foi inoculada nos sucos preparados e permaneceu em fermentação a 37° C por um período de 24 horas. O desenvolvimento microbiano e o pH dos sucos foram determinados a cada 2 horas, nas primeiras 6 horas e após 10 e 15 dias de estocagem sob refrigeração a 8°C para verificação da viabilidade.

#### 4.2.2 Elaboração dos sucos

Os sucos de manga e uva utilizados foram da marca comercial Frutt's e não continham em suas formulações conservantes e possuíam a adição de açúcar, pronto para o consumo. O suco foi distribuído em frascos estéreis e tamponado com solução de hidróxido de sódio até atingir o pH de 6,5.

#### 4.2.3 Determinação do crescimento microbiano durante a fermentação

Após os tempos de T0, T2, T4, T6 horas de fermentação, uma alíquota de 1 mL da cultura foi retirada e procedeu-se a diluição seriada. O inóculo se deu pelo método de profundidade (pour-plate) em meio MRS ágar. As placas foram incubadas por 48 horas a 37° C dentro de sacos plástico com sistema gerador de atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico Anaerobac®.

#### 4.2.4 Verificação da viabilidade celular sob refrigeração

Após o decorrer do tempo de fermentação de 6 horas, os sucos foram armazenados sob refrigeração a 8°C. Nos tempos de T10 e T15 dias de estocagem procedeu-se a contagem celular (pour-plate) e com as análises de pH e teor de açúcares (°Brix).

#### 4.2.5 Análise do pH

O pH foi determinado pela leitura direta em potenciômetro, calibrados com soluções tampão pH 4,0 e pH7,0, nos mesmos tempos estipulados no item 4.2.3. O procedimento metodológico foi realizado de acordo com Adolfo Lutz (1985).

#### 4.2.6 Análise do °Brix

O procedimento metodológico foi realizado de acordo com Adolfo Lutz (1985) sendo o teor de açúcar determinado pela leitura em refratômetro, calibrado com água destilada nos mesmos tempos determinados no item 4.2.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na determinação do crescimento microbiano e mudanças de pH no suco de manga e uva podem ser observado na figura 2.

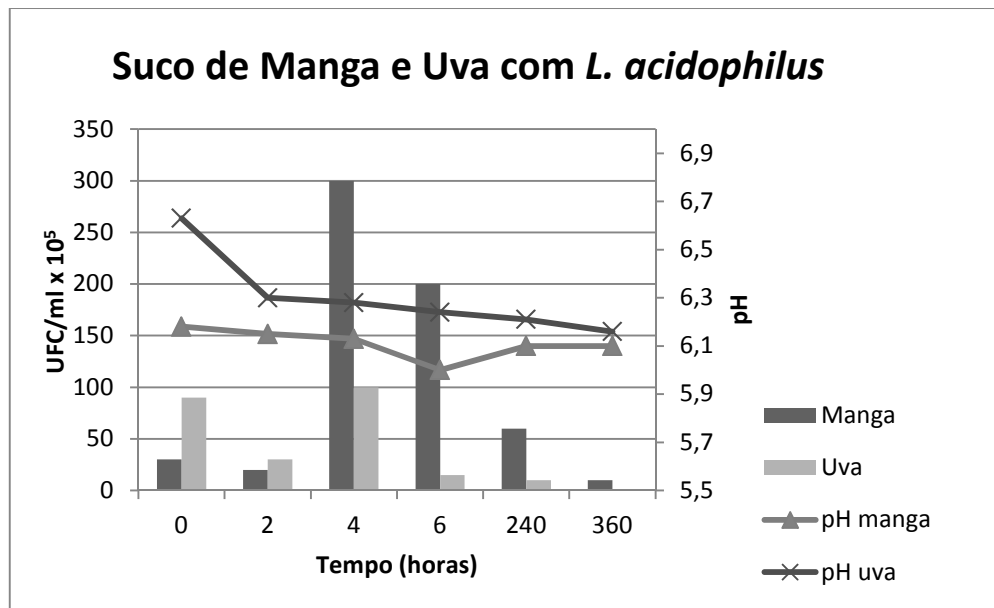


Figura 2 – Crescimento do probiótico e Alteração de pH no Suco de Manga e Uva

Pode-se verificar que a melhor contagem celular de *L. acidophilus* no suco de manga ocorreu em 4 horas de fermentação, atingindo  $3,0 \times 10^7$  UFC/ml. Porém, o fermentado permaneceu na incubação, o que pode ter resultado no decréscimo do micro-organismo devido à quantidade celular x disponibilidade de substrato. O valor de pH teve uma pequena redução, porém não sendo significativa para o desenvolvimento microbiano. No tempo T15d o crescimento microbiano decaiu para a concentração de inoculo inicial.

Sacarro et al (2009) relataram que as baixas contagens de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados é devido a diversos fatores como temperatura de incubação, pH, presença de oxigênio e outros micro-organismos, sendo que a viabilidade dessa microflora também depende de fatores como disponibilidade de nutrientes, quantidade de inoculo, tempo de fermentação, crescimento e fatores de inibição e temperatura de armazenamento. Segundo

Freitas (2012), ao estudar a viabilidade de culturas probióticas em iogurte, *L. acidophilus* foi considerada a cultura menos estável sendo que do 14° ao 21° dia de estocagem o micro-organismo apresentou crescimento insatisfatório tendo sua contagem em torno de 5 log UFC/ml.

Ao verificar a viabilidade do *L. acidophilus* associado com *B. lactis* em leite fermentado, Sacarro (2008) observou que mesmo com um inóculo inicial de  $10^7$  UFC/ml a estirpe de *L. acidophilus* apresentou baixa contagem, tendo redução de um ciclo logarítmico entre o primeiro e sétimo dia de estocagem e após 14 dias de armazenamento obteve valores em torno de  $10^5$  UFC/ml sendo considera a bactéria menos viável. Porém, no ensaio onde os dois probióticos foram associados, teve o maior valor de acidificação o que refletiu na firmeza e consistência do leite fermentado, já que é de interesse a obtenção de um produto com uma textura mais apropriada.

Oliveira et al (2002) aponta a perda de viabilidade de micro-organismos probióticos quando estocados por longos dias sob refrigeração e relata a redução de 1,0 ciclo logarítmico nas contagens de *L. acidophilus* após 28 dias de estocagem a 4°C.

Santos (2008) ao formular um suco de uva adicionado com *L. acidophilus* e suplementado com oligofrutose verificou que nas amostras onde foram inoculados  $10^7$  UFC/ml da cultura não houve sobrevivência das bactérias até o final de 8 dias de incubação mesmo com a adição de oligofrutose, apenas em uma amostra onde foi feito inóculo de  $10^8$  UFC/ml e adicionado 10% de oligofrutose houve sobrevivência do probiótico atingindo a quantidade mínima exigida pela legislação, que é de  $10^6$  UFC/ml de bactérias viáveis. Em relação ao pH do suco de uva, Santos (2008) observou que todas as amostras apresentaram o mesmo comportamento de pH, permanecendo constante até o 4° dia de armazenamento e sofrendo pequena diminuição nos dias posteriores.

No suco de uva a contagem no tempo T4h também foi o ideal para o desenvolvimento microbiano. Contudo, ocorreram alterações de pH um pouco mais evidentes no tempo de 2 horas, quando comparado ao suco de manga.

Ficou evidente que o suco de manga proporcionou melhores condições para o desenvolvimento bacteriano, quando comparado ao suco de uva. Contudo, independente do substrato, *L. acidophilus* se desenvolveu melhor no tempo T4 hs.

A figura 3 mostra o aspecto dos sucos após o período ideal de fermentação (aumento celular). Podemos observar que não houve alteração na coloração dos sucos.

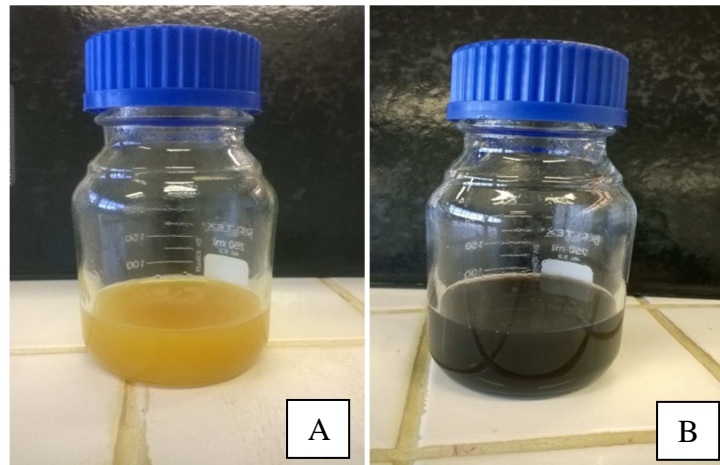


Figura 3 – Sucos probióticos fermentados de manga (A) e uva (B).

Fonte: Autoria Própria

Freitas (2012) comenta que os *Lactobacillus* por pertencerem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) são capazes de fermentar açúcares produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo resultando na acidificação do alimento.

O pH inicial do suco controle de manga e uva eram de 3,67 e 3,22 respectivamente e foram ajustados para 6,5 pois, segundo o estudo realizado por Coelho (2009) ao avaliar o crescimento do *L. casei* no suco de laranja em diferentes pH, verificou que o micro-organismo teve um crescimento significativo no pH de 6,0 a 30°C.

Champagne; Gardner (2008) ao correlacionarem a viabilidade com pH nos sucos de frutas adicionados com várias espécies de *Lactobacillus* e estocados por 80 dias a 4°C, verificaram que em sucos com o pH de 4,2 o crescimento das bactérias foi maior do que nos sucos com pH de 3,6, 3,8 e 4,0 mostrando que quanto maior o pH, maior o número de células viáveis.

Segundo Freire (2012) o valor de pH implica na atividade metabólica das bactérias, o que pode favorecer ou não o seu crescimento no meio desejado sendo ideal sempre verificar o pH inicial do alimento que receberá a cultura probiótica.

Thamer e Penna (2005) ao verificarem a contagem de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* em bebida láctea fermentada notaram que conforme ocorria a redução de pH, houve um decréscimo na contagem de células viáveis durante a estocagem.

Macedo et al (2008) ao estudar o crescimento de *Lactobacillus* ssp. em leite adicionado com mel observou que entre os micro-organismos testados, o *L. acidophilus* atingiu pH de 3,53 no final de 46 dias de estocagem com uma população de  $8,33 \times 10^{10}$  UFC/ml, porém o mel não estimulou significativamente o crescimento do probiótico sendo que a média da contagem foi de  $8,14 \times 10^{10}$  UFC/ml para o controle e  $8,34 \times 10^{10}$  UFC/ml para a amostra com mel.

Os açúcares presentes nos sucos de manga e uva foram consumidos parcialmente durante a fermentação e armazenamento, caracterizando o metabolismo do *L. acidophilus* como uma BAL que utiliza açúcares para a produção de ácido lático. O °Brix foi verificado a cada duas horas de fermentação até o tempo de seis horas e após 10 e 15 dias de estocagem sob refrigeração (Tabela 1).

**Tabela 1 – Teor de Açúcar nos Sucos Probióticos**

Tempos (horas)	Manga °Brix	Uva °Brix
Controle	11,2	13,2
0	11,2	13,2
2	11,0	12,8
4	11,0	12,6
6	10,8	12,6
240	10,6	12,6
360	10,6	12,2

Em ambos os sucos houve o consumo de açúcar até o 15° dia de estocagem, porém no suco de uva, apesar o decréscimo do °Brix (tabela 1) não houve crescimento do micro-organismo no fim da estocagem. Coelho (2009) ao produzir suco de laranja fermentado com *L. casei* observou que durante o armazenamento por 42 dias sob refrigeração, 81,55%, 44,14% e 54,62% de sacarose, glicose e frutose foram consumidos, respectivamente.



Yoon; Woodams; Hang (2004) verificou que o *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. delbrueckii* ao fermentarem suco de tomate, reduziram rapidamente 22% do teor de glicose da bebida, utilizando o substrato para a fermentação.

Mousavi et al. (2011) ao elaborar um suco de romã utilizando 4 cepas de probióticos (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* e *L. paracasei*) verificou o consumo de açúcar durante a fermentação e pode observar que as espécies *L. plantarum* e *L. delbrueckii* consumiram um alto teor de açúcar já nas primeiras horas de fermentação e tiveram um crescimento maior comparados as outras cepas.

Chick, Sin e Ustinol (2001) avaliaram a influencia do mel e outros açúcares quanto à acidez e viabilidade de quatro culturas: *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* e *B. bifidum*. Os micro-organismos foram incubados em leite reconstituído e suplementados com 5% de mel, frutose e sacarose, separadamente e as amostras foram analisadas de 0 a 24 horas. Todas as culturas permaneceram viáveis em todos os açúcares, porém a viabilidade não foi significativamente diferente entre os meios. Mesmo o mel sendo uma fonte de carboidratos fermentáveis podendo propiciar produção de ácido e conseqüentemente redução do pH, os autores sugerem que são os oligossacarídeos presentes no mel os responsáveis pelo aumento da produção de ácido láctico.

## 6 CONCLUSÃO

Os sucos de manga e uva mostraram-se um ótimo substrato para o crescimento do micro-organismo *Lactobacillus acidophilus*. Dependendo do tipo de fruta, concentração de açúcares, quantidade de inóculo e demais interferentes, o crescimento do probiótico foi diferenciado, porém, mostrando o potencial industrial para o desenvolvimento de sucos de fruta adicionados com essas culturas.

Considerando os resultados obtidos com o crescimento, viabilidade, pH e °Brix ambos os sucos são ótimas alternativas para a elaboração de uma bebida funcional atrativa e saudável, isenta de substratos lácteos trazendo inovação ao mercado de alimentos funcionais.

Para trabalhos futuros, mais estudos devem ser realizados para otimizar as condições de crescimento e viabilidade do micro-organismo em suco de fruta.

## REFERÊNCIAS

- BADARÓ, Andréia C. L. et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana. **Nutrir gerais – Revista digital de nutrição**, Ipatinga, v. 2, n. 3, p. 1 – 29. Ago./Dez. 2008.
- BRANDT, Kátia G.; SAMPAIO, Magda C.; MIUKI, Cristina J. Importância da microflora intestinal. **Revisões e ensaios**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 27-117. 2006.
- BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução nº18, de 30 de Abril de 1999. **Regulamento técnico de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde no rótulo**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>> Acesso em: 01 mai. 2012.
- BURITI; Flávia C. A ; SAAD, Susana M. I. ; Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Arquivos latino americanos de nutrição**, v. 57, n. 4, p. 373 – 380. 2007.
- COELHO, Jamile C. **Elaboração de bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei***. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e tecnologia de alimentos) – Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2009.
- COPPOLA, Mario M.; TURNES, Carlos G. Probióticos e resposta imune. **Ciência rural, Santa Maria**, v. 34, n. 4, p. 1297 – 1303. 2004.
- CHAMPAGNE, Claude P.; GARDNER, Nancy J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic *Lactobacilli* to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v.41, p. 539-543, 2008.
- CHICK, H.; SHIN, H.; USTINOL, Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 3, p. 478-481, 2001.
- FREIRE, Vagna A. P. **Viabilidade de culturas probióticas de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium ssp.* em iogurte adicionado de polpa e farinha do albedo de maracujá**. 2012. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia agroindustrial) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

LUCKOW, Tania.; DELAHUNTY, Celly. Which juice is “healthier”? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, p. 751-759. 2004.

LUTZ, Adolfo. São Paulo: Imesp, 1985, v.1, p. 18-21. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**: métodos físicos e químicos para análise de alimentos.

MACEDO, et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* ssp. e *Lactobacillus* ssp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MORAES, Fernanda P.; COLLA, Luciane M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Revista eletrônica de farmácia**, v.3, n.2, p.109 – 122. 2006.

MOUSAVI, Z. E.; MOUSAVI S. M.; RAZAVI, S. H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIANE, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World J Microbiol Biotchnol**, v.27, n.4, p. 123-128, 2011.

OLIVEIRA, Maricê N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probiótico. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 38, n.1, p. 1 – 21. 2002<sup>a</sup>.

OLIVEIRA, M. N. et al. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.67, n. 6, p. 2336-2341, 2002<sup>b</sup>.

SAAD, Susana M. I. Probióticos e prébióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1 – 15. 2006.

SACCARRO, Daniela M.; TAMIME, Adnan Y.; PILLEGGI, Lucia P. S.; OLIVEIRA, Maricê N. The viability of three probiotic organisms grown in yogurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p. 397-404, 2009.

SANTOS, Joice S.; XAVIER, Ana O.; BONOVENTI, Priscila; SOUZA, Roberta B.; GARCIA, Sandra. Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.4, p. 839-844, 2008.

SILVA, Neusa et al. **Manual de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

THAMER, Karime G.; PENNA, Ana L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prébióticos. **Ciência e tecnologia em alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, jul-set 2006.

THAMER, Karime G.; PENNA, Ana L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, p. 394-400, 2005.

YOON, Kyung Y.; WOODAMS, Edward E.; HANG, Yong D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **The Journal of Microbiology**, v.42, n.4, p. 315-318, 2004.