

**RAÍSSA HOLANDA CAVALCANTI DE ANDRADE**

**ESTABILIDADE E ACEITABILIDADE DE SUCOS**

**PROBIÓTICOS DE GOIABA (*Psidium guajava* L.)**

**CONTENDO *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469**

**RECIFE – PE**

**2017**

Universidade Federal de Pernambuco

Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

**Raíssa Holanda Cavalcanti de Andrade**

**Estabilidade e aceitabilidade de sucos probióticos de  
goiaba (*Psidium Guajava* L.) contendo *Lactobacillus  
rhamnosus* ATCC 7469**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Nutrição –  
Universidade Federal de Pernambuco,  
para obtenção do título de mestre em  
Nutrição.

Orientadora: Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia

Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia Moreira Azoubel

RECIFE-PE

2017

Catalogação na fonte  
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

A553e Andrade, Raíssa Holanda Cavalcanti de.  
Estabilidade e aceitabilidade de sucos probióticos de goiaba (*Psidium guajava* L.) contendo *Lactobacillus rhamnosus*) ATCC 7469 / Raíssa Holanda Cavalcanti de Andrade. – 2017.  
76 folhas : il. ;30 cm.

Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2017.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Alimento Funcional. 2. Sucos de Frutas e Vegetais. 3. Fermentação.  
I. Gouveia, Ester Ribeiro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-125)

**RAÍSSA HOLANDA CAVALCANTI DE ANDRADE**

“ESTABILIDADE E ACEITABILIDADE DE SUCOS PROBIÓTICOS DE  
GOIABA (*Psidium guajava L.*) CONTENDO *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469”

Dissertação aprovada em 21/02/2017

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Christine Lamenha Luna-Finkler

---

Dra. Fernanda Leitão Vaz

---

Dra. Maria Carolina de Albuquerque Wanderley

RECIFE-PE

2017

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição  
Ciência dos Alimentos**

**Reitor**

Prof.<sup>º</sup> Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**Vice-reitora**

Prof.<sup>ª</sup> Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação**

Prof.<sup>º</sup> Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Prof.<sup>º</sup> Nicodemos Teles de Pontes Filho

**Chefe do Departamento de Nutrição**

Prof.<sup>º</sup> Raul Manhães de Castro

**Subchefe do Departamento de Nutrição**

Prof.<sup>ª</sup> Edigleide Maria Figueirôa Barreto

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição**

Prof.<sup>ª</sup> Elizabeth do Nascimento

**Vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição**

Prof.<sup>ª</sup> Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo amor, educação, suporte e compreensão.

Aos amigos, que deram força e entenderam quando não pude estar presente.

À Mariana, amiga desde a graduação, que me incentivou a tentar o mestrado e juntas, fomos aprovadas, sem nem acreditarmos. Amiga, você foi muito guerreira por ter finalizado essa etapa, e eu fico muito feliz de ter vivenciado mais essa conquista!

Às mestrandas de alimentos de 2015, Thaís, Juliana, Hayanne, Fábia, Darletty e Anne, agradeço por ter conhecido vocês e ter formado uma turma que sempre se ajudou e torceu de verdade uma pela outra. Thaís e Ju, colegas que se tornaram amigas, obrigada pelas conversas, apoio e leveza nos momentos difíceis que vivemos. Desejo muito sucesso à todas!

À todas que fazem/fizeram parte do LabBio nesse tempo: Karen, Eloyza, Mariana, Natalie e Zilmar, obrigada pela disposição em ajudar e compartilhar todo o conhecimento de vocês comigo.

Aos técnicos do LEAAL – Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos Alexandre, Camilo, Olívia e Vivaldo, por me ajudarem com as análises e serem tão atenciosos. Passar um tempo com vocês, ainda que pouco, me deu muita experiência e conhecimento.

À professora e co-orientadora Patrícia Azoubel, agradeço a oportunidade de ter trabalhado com você, pelo apoio e disponibilidade do seu laboratório; a seu aluno Rafael Medeiros, pela doação da Stevia e ajuda na análise sensorial, obrigada! Zilmar, que conheci como aluna de Patrícia e ajudou tanto, além de te agradecer, saiba que você tem um lugar especial no meu coração!

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa) pelo apoio financeiro.

Gostaria de agradecer em especial a duas pessoas que, junto comigo, fizeram esse trabalho acontecer:

À professora e orientadora Ester Gouveia, agradeço profundamente a ajuda, apoio, presença, sinceridade e confiança. A Sr.ª não só me orientou, como me tornou uma profissional e pessoa melhor. Obrigada, Prof.ª, continue fazendo a diferença.

À Eloyza, pela parceria e imensa ajuda. Se no começo nem suportamos a ideia de trabalharmos juntas, no fim eu percebi que sem você eu não poderia ter feito nada! Obrigada pelas conversas, risadas, e topar fazer tudo que fosse contribuir para o nosso trabalho, desde dormir no laboratório até fazer placas e mais placas, gastro e mais gastro! Você fez toda a diferença nesse tempo, e hoje fico feliz em ver nosso crescimento e amadurecimento ao fim desse mestrado. Obrigada por tudo, Elô!

E Graças à Deus, pois sem Ele não teria tanto a agradecer!

Muito, muito, muito obrigada!

## RESUMO

Os alimentos com probióticos à base de vegetais vêm ganhando destaque no mercado por serem uma ótima fonte de vitaminas e minerais, como é o caso da goiaba (*Psidium guajava* L.), uma fruta largamente produzida no Brasil. Probióticos são micro-organismos vivos que tem a função de modular a microbiota intestinal, oferecendo benefícios à saúde. Para que o produto se torne mais nutritivo, outras substâncias podem ser adicionadas, como é o caso da inulina, um conhecido prebiótico que melhora a adesão intestinal dos probióticos, e a Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), um adoçante natural fonte de antioxidantes. O objetivo desse estudo foi avaliar a estabilidade de sucos probióticos de goiaba fermentado e não-fermentado, contendo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, durante 28 dias. Foram realizados ensaios de sobrevivência gastrointestinal simulada com 3 condições de sucos-controle, para determinar se a inulina e Stevia influenciariam na sobrevivência do micro-organismo, sendo as seguintes condições: não-fermentado, sem inulina e sem Stevia (SCNF); não-fermentado, com 5 g/L de inulina e sem Stevia (SCNFI); e fermentado, com 5 g/L de inulina e sem Stevia (SCFI). Os sucos probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF), ambos adicionados de inulina 5g/L e Stevia 10% v/v, foram analisados quanto a composição química, viabilidade, sobrevivência após ensaio de simulação gastrointestinal, pH, ácidos orgânicos cítrico e lático e concentração de glicose e frutose. A aceitabilidade dos sucos também foi avaliada quanto a intensidade de doçura, acidez, aceitabilidade global, preferência e intenção de compra. Os testes com as 3 condições de sucos demonstraram que a inulina não apresentou efeito e a Stevia foi capaz de aumentar a sobrevivência do micro-organismo no SNF e SF. Em relação à composição, os valores de umidade, cinzas, proteínas, carboidratos, lipídios e grau Brix foram similares em ambos os sucos, diferindo significativamente apenas na acidez titulável (5,5 - 10,3g/100g), carotenóides totais (543 - 833 mg/g) e compostos fenólicos (0,11 - 0,15 AGE mg/100 mL). O SF manteve a viabilidade inicial de 8 Log UFC/mL ao fim do estoque, enquanto o SNF reduziu de 9 para 8 Log UFC/mL. A sobrevivência após simulação gastrointestinal no dia inicial foi de 55% e 35% para o SNF e SF, respectivamente; porém, no último dia, essa sobrevivência reduziu para 25% no SNF e 28% no SF. Outros parâmetros como pH, ácido lático e concentração de glicose e frutose tiveram menores alterações no SF durante o estudo. A análise sensorial demonstrou que o SNF foi melhor aceito e preferido pelos provadores, entretanto, o SF obteve escores que possibilitam a compra e o consumo. Na análise de componentes principais (ACP), não houve diferença entre os sucos quando os atributos de aceitabilidade foram analisados ao mesmo tempo. Portanto, como o suco probiótico de goiaba fermentado apresentou maior estabilidade, contém o ácido lático e não apresentou diferença significativa na análise multivariada, foi considerado um produto mais adequado para elaboração e consumo.

**Palavras-chave:** Alimentos Funcionais. Sucos de Frutas. Fermentação. Sobrevivência Gastrointestinal.

## ABSTRACT

Foods with vegetable-based probiotics have been gaining prominence in the market because they are a great source of vitamins and minerals, as is the case of guava (*Psidium guajava* L.), a fruit widely produced in Brazil. Probiotics are living microorganisms that have the function of modulating the intestinal microbiota, offering health benefits. To make the product more nutritious, other substances can be added, such as inulin, a known prebiotic that improves bowel adhesion of probiotics, and Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), a natural sweetener source of antioxidants. The objective of this study was to evaluate for 28 days the stability of fermented and non-fermented probiotic guava juices containing *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Simulated gastrointestinal survival trials with 3 control juice conditions were performed to determine if inulin and Stevia would influence the survival of the microorganism, with the following conditions: unfermented, without inulin and without Stevia (NFCJ); Unfermented, 5 g / L inulin and without Stevia (NFICJ); And fermented with 5 g / L inulin and without Stevia (FICJ). Non-fermented juice (NFJ) and fermented juice (FJ), both added with 5 g/L inulin and 10% v/v Stevia were analyzed for chemical composition, viability, survival after gastrointestinal simulation test, pH, organic acids citric and lactic and glucose and fructose concentrations. The acceptability of juices was also evaluated as to the intensity of sweetness, acidity, overall acceptability, preference and buying intention. Tests with the 3 juice conditions showed that inulin had no positive or negative effect and Stevia increased the survival of the microorganism in the NFJ and FJ. In relation to the composition, the values of moisture, ashes, proteins, carbohydrates, lipids and total soluble solids were similar in both juices, differing only in titratable acidity (5,5 – 10,3g / 100g), total carotenoids (543 - 833 mg / g) and phenolic compounds (0.11 - 0.15 GAE mg / 100 mL). FJ maintained the initial viability of 8 log CFU / mL at the end of storage, while the NFJ reduced from 9 to 8 log CFU / mL. Survival after gastrointestinal simulation with 0 days was 55% and 35% for SNF and SF, respectively; however, the last day, that survival decreased to 25% in the NFJ and 28% in FJ. Other parameters such as pH, lactic acid and glucose and fructose concentration varied less in FJ during the study. The sensory analysis showed that the NFJ was better accepted and preferred by the tasters, however, the FJ obtained scores that make it possible to buy and consume. In the principal component analysis (PCA), there was no difference between juices when acceptability attributes were analyzed at the same time. Therefore, as the guava fermented probiotic juice presented greater stability, it contains lactic acid and did not present significant difference in the multivariate analysis, it was considered a more suitable product for elaboration and consumption.

Keywords: Functional Foods. Fruit Juice. Fermentation. Gastrointestinal Survival.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação das vias do metabolismo de hexoses homofermentativo e heterofermentativo das bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* ..... 21
- Figura 2** - Esquema representando as condições de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 para a adição no suco não-fermentado (SNF) e início do processo fermentativo no suco fermentado (SF) ..... 27
- Figura 3** – Fluxograma da elaboração dos sucos probióticos de goiaba não-fermentado e fermentado ..... 28
- Figura 4** – Viabilidade inicial e final (a) e sobrevivência (b) de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas em cinco condições de sucos de goiaba probióticos: não fermentado, sem inulina e sem adoçante (SCNF); não-fermentado, com inulina e sem adoçante (SCNFI); fermentado, com inulina e sem adoçante (SCFI); não fermentado, com inulina e com Stevia (SNF); fermentado, com inulina e com Stevia (SF). ..... 36
- Figura 5** – Viabilidade inicial e final e sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas em (a) suco não-fermentado (SNF) e (b) suco fermentado (SF) nos tempos inicial e final de estoque refrigerado. ..... 38
- Figura 6** – Concentração do ácido láctico e pH durante os estoques refrigerados dos sucos de goiaba probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF). ..... 39
- Figura 7** – Concentrações de (a) glicose e frutose e (b) ácido cítrico durante os estoques refrigerados dos sucos de goiaba probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF). ..... 40
- Figura 8** – Histogramas de frequência com respostas de intensidade de doçura (a) e acidez (b) com escala do ideal variando do muito menos intenso (-3) ao muito mais intenso (3) do ideal ..... 42
- Figura 9** – Histogramas de frequência com respostas de intensidade de aceitabilidade global (a) com escala hedônica que varia do desgostei extremamente (1) a gostei extremamente (9); e intenção de compra (b) com escala hedônica que varia de definitivamente não compraria (1) a definitivamente compraria (9) ..... 43

**Figura 10** - Análise dos componentes principais (ACP) executada com os quatro atributos (doçura, acidez, aceitabilidade global e intenção de compra) da análise sensorial.....45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição dos sucos utilizados para os ensaios de simulação de condições gastrointestinais .....	29
<b>Tabela 2</b> – Composição físico-química dos sucos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF) .....	35
<b>Tabela 3</b> – Médias das respostas obtidas nos testes de doçura, acidez, aceitação e intenção de compra dos sucos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF) .....	41

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ACP – Análise de Componentes Principais

ATCC – American Type Culture Collection

BAL – Bactérias láticas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CAF / FFC – Centro de Alimentos Funcionais/ Functional Food Center

FAO/OMS – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) /Organização Mundial de Saúde

IAL – Instituto Adolfo Lutz

SCNF – Suco controle probiótico de goiaba não-fermentado

SCNFI – Suco controle probiótico de goiaba não-fermentado, com inulina

SCFI – Suco controle probiótico de goiaba fermentado, com inulina

SNF – Suco probiótico de goiaba não-fermentado, com inulina e Stevia

SF – Suco probiótico de goiaba fermentado, com inulina e Stevia

UFC – Unidade Formadora de Colônias

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Alimentos funcionais.....	17
2.1.1 Sobrevivência de probióticos no trato gastrointestinal.....	19
2.2 O gênero <i>Lactobacillus</i> .....	20
2.3 Alimentos probióticos à base de vegetais.....	22
3 HIPÓTESE .....	24
4 OBJETIVO GERAL.....	25
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5 MÉTODOS.....	26
5.1 Local e período de estudo .....	26
5.2 Cultura probiótica .....	26
5.3 Condições das fermentações.....	26
5.4 Elaboração dos sucos de goiaba.....	27
5.4.1 Composição dos sucos utilizados para ensaios de simulação gastrointestinal.....	28
5.5 Análises físico-químicas.....	29
5.5.1 Composição físico-química.....	29
5.5.2 pH.....	30
5.5.3 Ácidos orgânicos.....	30
5.5.4 Glicose e frutose.....	31
5.6 Análises microbiológicas.....	31
5.6.1 Viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.....	31
5.6.2 Sobrevivência de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas.....	32
5.7 Análise sensorial.....	33
5.8 Análise estatística.....	34
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Composição físico-química dos sucos probióticos.....	35
6.2 Sobrevivência de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 às condições gastrointestinais simuladas.....	36

6.3 Avaliações do estoque dos sucos probióticos.....	38
7 DISCUSSÃO.....	46
8 CONCLUSÕES.....	52
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICE.....	71
APÊNDICE A – Formulário de aceitabilidade de intenção de compra.....	72
ANEXOS.....	73
ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa...	74
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a população vem se conscientizando sobre o impacto da alimentação na saúde, o que levou a um aumento pela procura de alimentos funcionais. Dentre essa categoria de alimento, destacam-se os produtos probióticos, que são micro-organismos que podem beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (SILVA, BARREIRA & OLIVEIRA, 2016).

A cultura probiótica pode ser adicionada em diversas matrizes alimentares, sendo a viabilidade e a atividade metabólica características importantes a se considerar na escolha da espécie a ser utilizada em um alimento (BAKR, 2015). É interessante que a adição do micro-organismo seja em um produto que já possui uma ingestão frequente, visto que não serão observados os benefícios esperados se o consumo não for regular (CÉSPEDES et al., 2013).

A grande parte dos alimentos probióticos no mercado são do setor de laticínios, na maioria iogurtes e leites fermentados. Esses produtos já possuem uma aceitação, porém limita o consumo por pessoas que não podem ou não desejam consumir fontes de origem animal. Bebidas probióticas à base de frutas seriam uma opção que poderia agradar todo tipo de consumidor, além de ser uma elevada fonte de vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras (MARHAMATIZADEH et al., 2012).

O suco de goiaba é considerado altamente nutritivo devido ao seu alto teor de vitamina C e antioxidantes (THAIPONG et al., 2006). No entanto, os maiores desafios para a viabilidade e sobrevivência do micro-organismo em sucos de frutas são o baixo pH, alta concentração de oxigênio dissolvido e quantidades insuficientes de aminoácidos livres e peptídeos (COSTA et al., 2017).

Para agregar maior valor nutritivo e atribuir propriedades sensoriais de doçura e textura a esses produtos funcionais, alguns ingredientes podem ser adicionados, como é o caso da inulina, um polissacarídeo e conhecido prebiótico utilizado por micro-organismos que habitam o intestino (SAAD, 2006; SHOIAB et al., 2016), e a Stevia, um adoçante natural que além de ser uma excelente fonte de antioxidantes, é

uma alternativa para diminuir o uso de sacarose em produtos alimentícios (BARROSO et al., 2016).

A linhagem *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 vem sendo utilizada em sucos probióticos fermentados e não-fermentados (FARIAS, SOARES & GOUVEIA, 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016). A fermentação do alimento, além de ser uma forma de preservação, faz com que o micro-organismo produza ácido lático, um agente antimicrobiano, podendo impedir a contaminação do produto durante o período de estocagem, além de contribuir beneficamente para o consumidor (PIMENTEL et al., 2015).

Apesar das vantagens desse processo fermentativo, a sobrevivência da bactéria às condições do trato gastrointestinal é um desafio para o desenvolvimento de um produto. O pH ácido do estômago combinado a presença de bile no intestino pode prejudicar essa sobrevivência, influenciando diretamente na proliferação e colonização do probiótico (DALIRI & LEE, 2015).

Ainda não existem estudos disponíveis comparando produtos fermentados e não-fermentados utilizando a goiaba, bem como análises de como o processo fermentativo pode influenciar na sobrevivência do micro-organismo durante o período de estoque e, principalmente, no trato gastrointestinal. Diante dos benefícios de um produto probiótico, é de suma importância pesquisas sobre a elaboração desses produtos à base de frutas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Alimentos funcionais

Durante os últimos anos, as indústrias de alimentos perceberam um consumidor mais exigente, que acredita que o alimento contribui diretamente para sua saúde, e introduziram no mercado uma nova categoria denominada de alimentos funcionais. Para que um produto possa ser conhecido por essa propriedade, o Centro de Alimentos Funcionais (CAF) define alimentos funcionais como “alimentos naturais ou processados que contém compostos biologicamente ativos conhecidos ou desconhecidos; que não apresentam efeitos tóxicos e que exercem benefícios à clinicamente comprovados e documentados para a prevenção ou tratamento de doenças crônicas” (FFC, 2014).

Do ponto de vista nutricional, não é interessante que um produto funcional sofra muitos processamentos, sendo mínima a utilização de aditivos alimentares. O açúcar é o principal aditivo empregado, e seu consumo em alimentos vem sendo associado a um maior risco de sobrepeso e obesidade (DELLA TORRE et al, 2016; RAMÍREZ-VÉLEZ et al., 2016), sendo necessária a substituição da sacarose por outros adoçantes naturais, como é o caso da Stevia. Seu uso é regulamentado no Brasil desde 2008, sendo considerado um aditivo alimentar (BRASIL, 2008 a).

A Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) é um arbusto perene pertencente à família Asteraceae que cresce em áreas tropicais e subtropicais da América do Sul, e suas folhas contêm substâncias específicas (glicosídeos), que produzem um sabor doce (SHIVANNA et al, 2013; CHATURVEDULA, UPRETI & PRAKASH, 2011). O extrato de Stevia possui vantagens como: são naturais, não-tóxicos, não-calóricos, não-fermentativos e não mutagênicos (YÜCESAN et al., 2016). Devido ao seu alto poder adoçante, a Stevia pode ser considerada como um substituto da sacarose de baixo custo (GUPTA et al., 2013). A Stevia é cultivada em todo mundo, mas principalmente na China, que detém 80% da produção mundial, e a sua produção e consumo vem aumentando em países como o Brasil, que em 2013 importou US\$ 8 milhões e exportou US\$ 2,7 milhões (INDUSTRYARC; BRASIL, 2014).

Dentre as substâncias que podem ser classificadas como alimentos funcionais, estão os prebióticos. Os prebióticos são ingredientes alimentares que por não serem digeridos pelo trato gastrointestinal humano, são fermentados pela microbiota intestinal, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de micro-organismos benéficos no cólon (DUNCAN & FLINT, 2013). As bactérias probióticas possuem um metabolismo sacarolítico, ou seja, são capazes de fermentar carboidratos não digeridos no intestino superior, e essa fermentação gera substratos que servirão de energia para outras bactérias, consequentemente levando ao aumento do microbioma (SLAVIN, 2013).

A inulina é um prebiótico encontrado em vegetais, sendo a chicória (*Cichorium intybus*) sua maior fonte (ÁLVAREZ-BORROTO et al., 2015). Possui em sua estrutura uma mistura de oligo- e polissacarídeos (AIDOO, AFOAKWA & DEWETTINCK, 2014) e sua utilização em alimentos já é consagrada, devido aos diversos estudos comprovando seus efeitos na inibição de patógenos, aumento da sobrevivência e adesão intestinal de probióticos (BOSSCHER, VAN LOO & FRANCK, 2006; PARKAR et al., 2010; NAZZARO et al., 2012).

Os probióticos são micro-organismos que, quando ingeridos, são capazes de modular a microbiota intestinal, neutralizando possíveis disfunções e antagonizando patógenos (CEAPA et al., 2013; AMARA & SHIBL, 2015). Para que uma linhagem seja considerada probiótica, deve possuir a capacidade de resistir às variações de pH dos sucos gástrico e entérico (FAO/WHO, 2002). Além disso, devem ser capazes de proliferar e colonizar o trato digestivo, devem ser seguros, e manter a sua eficácia durante o prazo de validade do produto (SAAD et al., 2013).

As bactérias probióticas possuem diversos mecanismos de ação. Para o tratamento de doenças infecciosas, ocorre a secreção de substâncias chamadas bacteriocinas e ácidos orgânicos, reduzindo a aderência de bactérias patogênicas; produzem substâncias que modulam o sistema imune com a indução de citoquinonas anti-inflamatórias, reduzindo alergias (HEMAISWARYA et al., 2013; FONG et al., 2015).

Várias pesquisas já comprovaram os benefícios da utilização de probióticos em tratamentos de doenças como diarreia crônica, síndrome do intestino irritável e infecções urogenitais (ABAD & SAFDAR, 2009; HEMPEL et al., 2012; FORD et al.,

2014). Algumas espécies de bactérias que pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são largamente utilizadas como probióticas em alimentos (BEDANI et al., 2014; ROLIM et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Acerca da legislação, o primeiro país a implementar um sistema regulamentando os probióticos foi o Japão, em 1991; em 1995, foi a vez da Europa definir e regulamentar (ARORA & BALDI, 2015). A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu o termo probióticos em 2002, além de estabelecer a quantidade mínima viável no momento do consumo de  $10^6$  a  $10^7$  log UFC / 100 mL de produto (FAO/WHO, 2002). Em 1999, O Brasil publicou a primeira resolução para a regulamentação de alimentos funcionais, sendo o primeiro país das Américas a regulamentar essa classe (ARORA & BALDI, 2015).

Em 2008, houve a publicação de uma lista de produtos com alegações de propriedades funcionais aprovadas, dentre eles, os probióticos. Nessa resolução, eram apenas considerados probióticos bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, e os requisitos específicos estipulavam a quantidade mínima viável ( $10^8$  a  $10^9$  log UFC/ porção do produto), laudo para comprovar a viabilidade e teste de resistência à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2008 b). Em 2016, ocorreram mudanças para a regulamentação de um produto probiótico, sendo adicionados requisitos específicos como a caracterização do micro-organismo e a demonstração de eficácia, requisito esse que pode garantir ao consumidor o benefício esperado para esse tipo de produto (BRASIL, 2016).

### **2.1.1 Sobrevivência de probióticos no trato gastrointestinal**

A sobrevivência de probióticos no trato gastrointestinal é influenciada por alguns fatores, sendo os mais limitantes o pH estomacal, presença de bile e enzimas digestivas (PITINO et al., 2010). Ao desenvolver um produto desse tipo, a indústria deve levar esses fatores em consideração e dispor de técnicas e/ou processos que possam permitir a eficácia do alimento quando consumido.

Técnicas como a microencapsulação, impregnação à vácuo e imobilização em filmes comestíveis vem sendo empregadas para a incorporação de probióticos em

alimentos, apresentando bons resultados em relação à sobrevivência gastrointestinal *in vitro* (MARTINS et al., 2013). Porém, ainda são tecnologias de alto custo para serem aplicadas à nível industrial, o que limitaria a acessibilidade do produto para o mercado consumidor.

A fermentação é um método antigo de preservação do alimento, e por muito tempo, foi a técnica utilizada para manter a viabilidade do micro-organismo em alimentos (KUMAR, VIJAYENDRA & REDDY, 2015). Além de preservar, o processo fermentativo produz *flavours*, aromas e texturas desejadas, removendo possíveis fatores antinutricionais presentes nos alimentos (SWAIN et al., 2014).

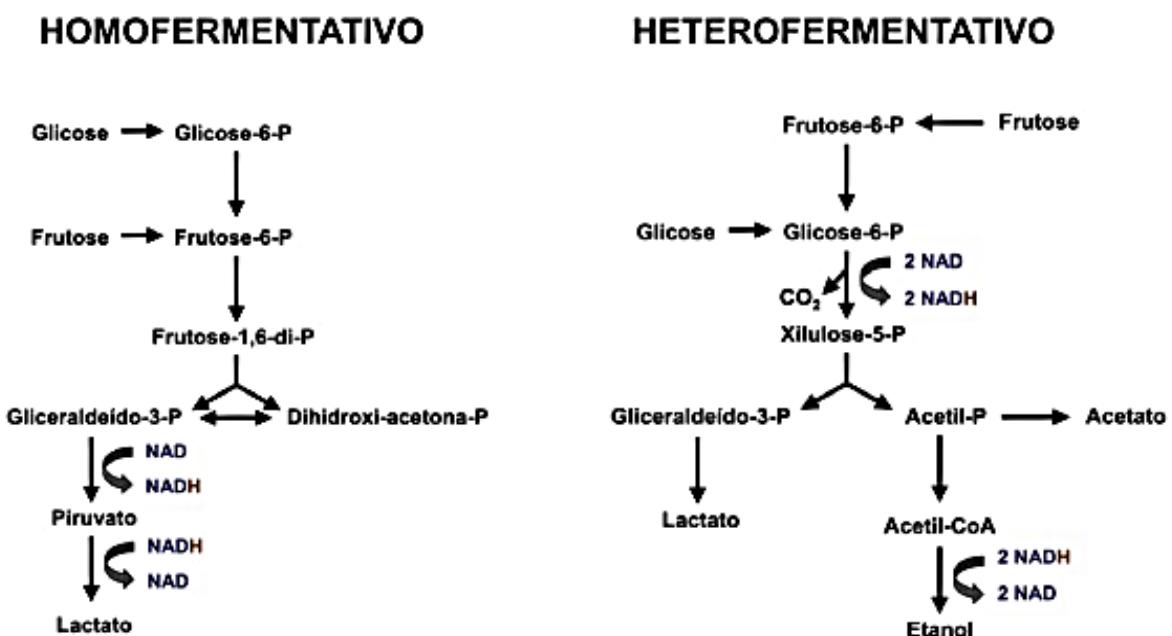
Tanto a fermentação como a adição direta do micro-organismo em sucos de frutas vem sendo estudadas no que diz respeito a sobrevivência gastrointestinal. Em suco de Maracujá da Caatinga fermentado, *L. rhamnosus* ATCC 7469 se manteve estável durante o teste de simulação utilizando pH 2.7 e pH 7, apresentando sobrevivência em torno de 90%; em suco de maçã não-fermentado adicionado de *L. rhamnosus*, a taxa de sobrevivência foi de 20% após exposição a pH 2 durante 30 minutos (FARIAS, SOARES & GOUVEIA, 2016; GANDOMI et al., 2016). Mais estudos devem ser realizados para investigar a sobrevivência do micro-organismo em sucos de frutas fermentados e não-fermentados, e assim determinar qual processo pode ser desejável para a elaboração de um produto.

## 2.2 O gênero *Lactobacillus*

Os Lactobacilos são bastonetes Gram-positivos pertencentes ao grupo de bactérias lácticas (BLA) (BERNARDEU et al., 2008) e são habitantes da cavidade oral humana, do trato intestinal e da vagina (HOLZAPFEL et al., 2001). As espécies *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. zeae* e *L. rhamnosus*, que compõem o grupo taxonômico *Lactobacillus casei*, apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes (BURITI & SAAD, 2007).

A divisão clássica de Lactobacilos está baseada em suas características fermentativas: homofermentativos; heterofermentativos obrigatórios e

heterofermentativos facultativos (STILES & HOLZAPFEL, 1997). Lactobacilos homofermentativos incluem aqueles que convertem hexoses exclusivamente em ácido lático; heterofermentativos obrigatórios convertem hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol, gás carbônico e ATP; e por fim, heterofermentativos facultativos incluem lactobacilos que convertem hexoses em ácido lático e também podem produzir ácido acético e/ou etanol (COSTA, 2006; BURITI & SAAD, 2007). A Figura 1 apresenta o metabolismo das hexoses pelo gênero *Lactobacillus*.



**Figura 1** – Representação das vias do metabolismo de hexoses homofermentativo e heterofermentativo das bactérias láticas do gênero *Lactobacillus* (COSTA, 2006)

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria heterofermentativa facultativa e generalista, isto é, é capaz de crescer em diversas condições, pois é encontrada tanto em diferentes cavidades humanas (intestino, vagina), como também em vários produtos alimentícios artesanais e industriais (DOUILLARD et al., 2013). Seu potencial probiótico já foi largamente estudado e comprovado, e a linhagem comercial mais utilizada tanto em tratamento de doenças como em alimentos é

*Lactobacillus rhamnosus* GG, originalmente isolada do intestino humano (LI et al., 2016).

Outras linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* vêm sendo isoladas e empregadas e um exemplo é a cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Essa bactéria vem sendo utilizada na indústria alimentar (TUOMOLA & SALMINEN, 1998). Além de produtos lácteos, essa espécie pode ser inoculada em produtos vegetais, como é o caso de sucos de frutas (FARIAS, SOARES & GOUVEIA, 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016).

### 2.3 Alimentos probióticos à base de vegetais

Tradicionalmente, os probióticos foram adicionados em alimentos à base de leite, como é o caso de iogurtes e leites fermentados. No entanto, o aumento no número de indivíduos que devem evitar o consumo de produtos lácteos pois apresentam alergia a proteína do leite, intolerância a lactose, altas taxas de colesterol e/ou são adeptos do vegetarianismo e veganismo, trouxe a necessidade da elaboração de alimentos probióticos de origem vegetal, como é o caso de produtos de frutas, cereais, vegetais e carnes (BAKR, 2015).

Para que uma fonte vegetal seja considerada um bom veículo alimentar para os probióticos, sua composição deve promover o crescimento, viabilidade, sobrevivência e tolerância aos ácidos e bile (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010). Sucos de frutas possuem um grande potencial para se tornarem produtos probióticos devido à características como seu teor de vitaminas, minerais e antioxidantes, e pode ser consumido por uma grande variedade de pessoas (MARHAMATIZADEH et al., 2012). A adição de micro-organismos em alimentos pode causar off-flavours, que são sabores indesejados em produtos alimentícios, sendo indicada a escolha de frutas tropicais na elaboração desses produtos, pois podem mascarar esses sabores desagradáveis devido ao seu aroma e sabor forte (LUCKOW et al., 2006).

A goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) ocupa lugar de destaque entre as frutas tropicais brasileiras, posição garantida pelo seu elevado valor nutricional: Contém altos teores de açúcares, vitamina A e vitaminas do grupo B, como a tiamina

e a niacina, além de teor significativo de fósforo, potássio, ferro e cálcio, sendo também rica em fibras (BRASIL, 2010). Ainda apresenta altos níveis de ácido ascórbico (50-300 mg/100 g peso fresco), o que é de três a seis vezes maior do que a laranja (THAIPONG et al., 2006).

Em 2012, o Brasil produziu 345,3 mil toneladas de goiaba vermelha, sendo Pernambuco o segundo maior produtor nacional (BRASIL, 2012). Apesar dessa alta produção, a goiaba é um fruto que apresenta reduzida vida pós-colheita, por apresentar aumento na produção de etileno, taxa respiratória alta, rápida perda de firmeza e incidência de podridões (SINGH & PAL, 2008). Estas características limitam o potencial de armazenamento, comercialização e exportação, devendo ser incentivado tanto o consumo dessa fruta pela população local, como o desenvolvimento de geleias, doces e sucos.

A goiaba já foi utilizada no desenvolvimento de produtos probióticos. Buriti, Castro & Saad (2010) desenvolveram um *mousse* com *L. acidophilus*; Bedani et al. (2014) adicionaram a polpa de goiaba em iogurte de soja; Dipjyoti, Sourangshu & Mohanasrinivasan (2015) e Bhat et al. (2015) utilizaram a goiaba na produção de suco e polpa fermentados com *L. plantarum*, respectivamente.

### 3 HIPÓTESE

O micro-organismo *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi capaz de manter uma viabilidade ideal para consumo e sobreviveu às condições gastrointestinais simuladas, nos sucos probióticos de goiaba fermentado e não-fermentado, durante todo o tempo de armazenamento em que foi estudado.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a estabilidade e a aceitabilidade durante estoque refrigerado de sucos de goiaba (*Psidium guajava* L.) probióticos, fermentado e não-fermentado, contendo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

##### **Objetivos específicos:**

- Verificar a influência da inulina e Stevia na sobrevivência do micro-organismo em ensaios simulados de condição gastrointestinal, através da elaboração de sucos probióticos controle;
- Analisar a composição físico-química dos sucos probióticos não-fermentado e fermentado;
- Determinar a viabilidade inicial e final e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 após condições simuladas do trato gastrointestinal, no início e fim do estoque;
- Avaliar alterações de pH, ácidos orgânicos, glicose e frutose durante o armazenamento;
- Avaliar os atributos sensoriais e intenção de compra dos sucos probióticos com 28 dias de estoque.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Local e período do estudo

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bioprocessos e Bioprodutos (LabBio, Departamento de Antibióticos, UFPE), de Processos Químicos (Departamento de Engenharia Química, UFPE), de Experimentação e Análise de Alimentos – LEAAL, e de Técnica Dietética e Análise Sensorial (Departamento de Nutrição, UFPE), no período de outubro de 2015 a dezembro de 2016.

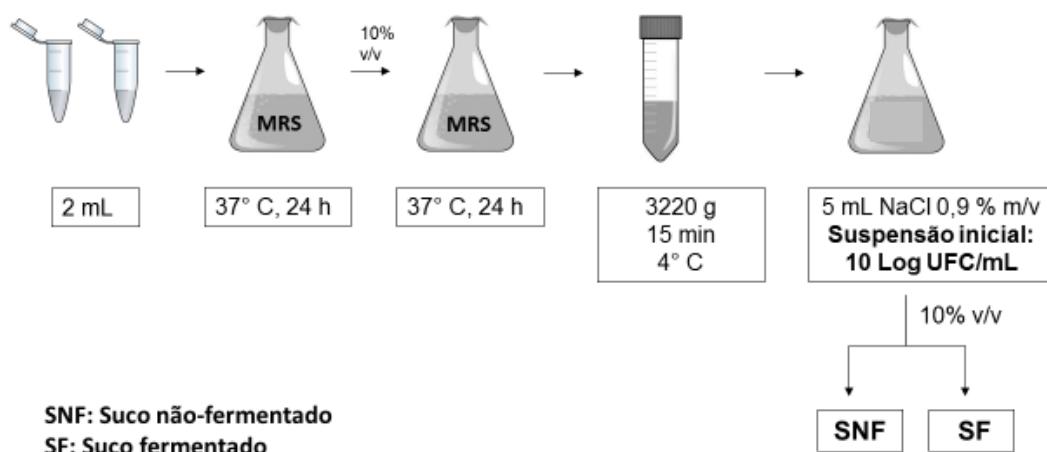
### 5.2 Cultura probiótica

A cultura comercial *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia, Estados Unidos) foi preservada em glicerol a 10 % (v/v) a -20 °C (SOLA et al., 2012). Foram utilizados tubos *eppendorfs* para o seu armazenamento, e cada tubo continha 1 mL da suspensão microbiana em glicerol.

### 5.3 Condições das fermentações

As suspensões microbianas de dois tubos *eppendorfs* foram transferidos para frasco de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultura MRS (DE MAN ROGOSA e SHARPE, MERCK, Darmstadt, Alemanha), o qual foi mantido a 37°C em estufa (SPLABOR SP-101/216), durante 24 horas. Após esse período, 2,5 mL foram transferidos para outro frasco de 125 mL contendo 22,5 mL do mesmo meio de cultura, sendo incubado a 37°C (SPLABOR SP-101/216) por mais 24 horas. A suspensão microbiana foi centrifugada (Thermo Scientific BR4-i) durante 15 minutos a 4°C e 3.220 g. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspandido em 5 mL de solução salina 0,9 % (m/v). Essa suspensão foi utilizada no valor de 10% v/v tanto para a

adição no suco não-fermentado (SNF), como também para realizar a fermentação no suco fermentado (SF), como ilustra a Figura 2:



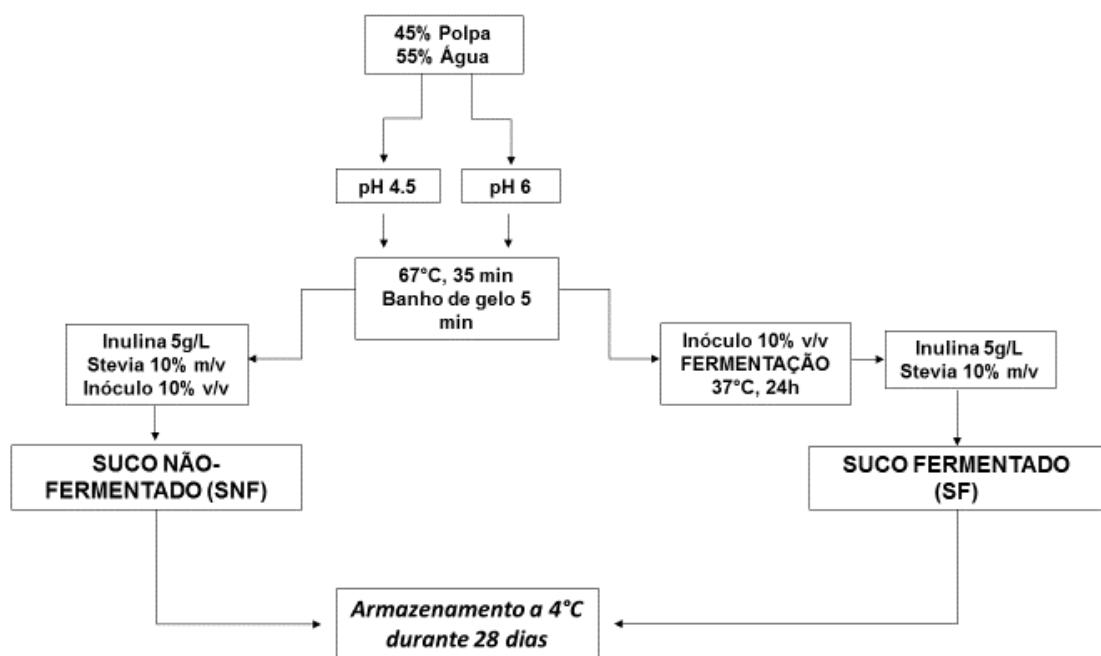
**Figura 2** - Esquema representando as condições de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 para a adição no suco não-fermentado (SNF) e início do processo fermentativo no suco fermentado (SF)

#### 5.4 Elaboração dos sucos de goiaba

Para o preparo do suco, a quantidade de polpa foi adicionada de acordo com a Legislação vigente para sucos tropicais (BRASIL,2003). Para cada 100 mL de suco produzido foram adicionados 45 gramas de polpa de goiaba não pasteurizada (Polpas Santa Amélia, Igarassu, PE, Brasil), sendo o restante do volume completado com água destilada. Após o preparo, o pH foi ajustado para 4,5 com NaOH 1M (BRASIL, 2007) com potenciômetro digital (Jenway 3510) e a bebida pasteurizada a 67°C em banho-maria durante 35 minutos, sendo imediatamente resfriada em banho de gelo por 5 minutos. A quantidade de inulina (Roval, PE, Brasil) e Stevia (SteviaFarma, PR, Brasil) adicionadas foram nas concentrações de 5 g/L e 10% m/v, respectivamente. A suspensão microbiana foi inoculada, em condições assépticas, na proporção 10 % v/v e o suco elaborado foi mantido sob refrigeração a 4°C durante 28 dias.

Para o preparo do suco fermentado, foi adicionada a mesma quantidade de polpa utilizada no preparo do suco não fermentado. O pH foi ajustado para 6 com

NaOH 1M com potenciômetro digital (Jenway 3510) e a bebida pasteurizada a 67°C em banho-maria durante 35 minutos, sendo imediatamente resfriada em banho de gelo por 5 minutos. A suspensão microbiana foi inoculada, em condições assépticas, na proporção 10% v/v e o suco foi fermentado durante 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica (SPLABOR SP-101/216). Ao final da fermentação, foram adicionados inulina e Stevia nas mesmas concentrações já citadas no preparo do suco não fermentado, que também foi mantido sob refrigeração a 4°C durante 28 dias. A Figura 3 esquematiza como ambos os sucos foram processados.



**Figura 3 – Fluxograma da elaboração dos sucos probióticos de goiaba não-fermentado (SNF) e fermentado (SF)**

#### 5.4.1 Composição dos sucos utilizados para ensaios de simulação gastrointestinal

A fim de verificar se a inulina e Stevia poderiam influenciar na sobrevivência do micro-organismo nos sucos, foram realizados experimentos de condições gastrointestinais simuladas (item 5.6.2) em cinco formulações de sucos probióticos,

sendo três formulações-controle (SCNF, SCNFI e SCFI), e os sucos que seriam estudados no presente trabalho, não-fermentado (SNF) e fermentado (SF). A composição de todos os sucos está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição dos sucos probióticos utilizados para os ensaios de simulação de condições gastrointestinais

<b>Sucos probióticos*</b>	<b>Fermentação (37 °C, 24 h)</b>	<b>Inulina 5 g/ L</b>	<b>Stevia 10% m/v</b>
SCNF			
SCNFI		X	
SCFI	X	X	
SNF		X	X
SF	X	X	X

\*Sucos probióticos SCNF: suco-controle não-fermentado, sem inulina e Stevia; SCNFI: suco-controle não-fermentado com inulina; SCFI: suco-controle fermentado com inulina; SNF: suco não-fermentado com inulina e Stevia; SF: suco fermentado com inulina e Stevia.

## 5.5 Análises físico-químicas

### 5.5.1 Composição físico-química

Para a composição centesimal dos sucos probióticos foram determinados, de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008): Umidade, por secagem em estufa a 105°C; o resíduo mineral fixo, por incineração em mufla a 550°C; o teor de proteínas, pelo método de Kjeldahl; e o teor de lipídios, pelo método de extração contínua de Soxhlet. O teor de carboidratos foi calculado por diferença. Os resultados foram expressos em relação a matéria seca (m.s.). O valor energético total (VET) foi calculado através do somatório das calorias oferecidas pelos macronutrientes, a saber, 4 Kcal/g para carboidratos e para proteínas e 9 Kcal/g para lipídios.

A acidez titulável, sólidos solúveis totais (<sup>o</sup> Brix) e quantificação de vitamina C pelo método titulométrico de Tillmans também foram determinados de acordo com IAL (IAL, 2008). A extração do teor de carotenóides totais foi efetuada pelo método descrito por Rodriguez-Amaya (2001), sendo a quantificação realizada através da leitura de absorbância em espectrofotômetro (Femto, 600Plus) ajustado no comprimento de onda de 470 nm e resultado expresso em mg/100 mL; os compostos fenólicos totais foram determinados conforme o método de Folin-Ciocalteau (SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA, 1999) e para sua quantificação foi construída uma curva de ácido gálico nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,09 g/L que obteve um  $R^2$  maior que 0,999. Os compostos fenólicos foram expressos em miligrama de ácido gálico equivalente (AGE) por 100 mL de suco.

### **5.5.2 pH**

O pH foi medido em potenciômetro digital (Jenway 3510) com 0,14 e 28 dias de estoque.

### **5.5.3 Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos lático e cítrico foram determinados com 0, 14 e 28 dias de estoque, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) era equipado com uma bomba quaternária com desgaseificador, acoplado um forno para controlar a temperatura da coluna (29 °C), um injetor automático e um detector por arranjo de diodos (DAD). O software utilizado para a aquisição de dados foi o Soluções-LC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Uma coluna de troca iônica de 300 x 7,8 milímetros (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, EUA), com 9 µm de tamanho de partículas, foi utilizada. Um sistema de eluição isocrática foi aplicado para a fase móvel ( $H_2SO_4$  5 mM) e as condições da corrida foram de 20 minutos com uma vazão da fase móvel igual a 0,6 mL/ min. As amostras foram diluídas em fase móvel e filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,2 µm. Para construção das curvas de calibração foram injetados ácido cítrico (Dinâmica,

SP, Brasil), na concentração de 0,1 g/L, e ácido lático (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), na concentração de 1 g/L. Os volumes injetados para ambos foram de 1, 3, 6, 10 e 20  $\mu$ L e as curvas apresentaram um  $R^2$  maior que 0,999.

#### **5.5.4 Glicose e frutose**

A determinação de glicose e frutose também foi realizada com 0, 14 e 28 dias de estoque, através da CLAE, com temperatura de 40 °C e detector por índice de refração. Foi utilizado o mesmo tipo de coluna, composição e sistema de eluição de fase móvel usados na determinação dos ácidos. As condições da corrida foram de 15 minutos com uma vazão da fase móvel igual a 0,6 mL/ min. As amostras foram diluídas em fase móvel e filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,2 $\mu$ m. Para construção das curvas de calibração foram injetados frutose e glicose (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), na concentração de 1 g/L. Os volumes injetados para ambos os carboidratos foram de 10, 15, 20, 25 e 30  $\mu$ L e as curvas apresentaram um  $R^2$  maior que 0,999.

### **5.6 Análises microbiológicas**

#### **5.6.1 Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469**

A viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi analisada nos dias 0, 14 e 28 de armazenamento dos sucos elaborados. Amostras de 1 mL foram retiradas e diluídas em 9 mL de solução salina 0,9% estéril, utilizando-se tubo estéril. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 1 mL para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução salina 0,9% estéril. Diluições decimais seriadas dos sucos probióticos foram realizadas, até a diluição  $10^{-7}$ .

Alíquotas de 100  $\mu$ L foram incubadas em placas de Petri estéreis e adicionadas de MRS 55g/L (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e Ágar 20g/L (Neogen, Michigan,

EUA). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (SPLABOR 101/216) a 37°C por 48 horas. Após esse período, a contagem foi realizada e o resultado expresso em logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitros de produto (log UFC/mL).

#### **5.6.2 Sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas**

A linhagem nos sucos não-fermentado e fermentado foi submetida às simulações gástricas e entéricas para avaliar a sobrevivência do probiótico nos dias 0 e 28 de estoque. O experimento foi realizado de acordo com o método descrito por Buriti, Castro & Saad (2010), com algumas modificações. Foi escolhido aleatoriamente um dos frascos estocados em câmara fria, que continham cerca de 30 mL de suco. Na simulação da fase gástrica, o pH foi ajustado para 2 com HCl 1M. A enzima pepsina (Dinâmica, SP, Brasil) foi adicionada à amostra para chegar a uma concentração de 3 g/L. Os frascos foram incubados a 37°C e agitados a 150 rpm em incubadora rotativa (Tecnal TE-422) durante 2 h.

Na próxima etapa, o pH das amostras foi ajustado para 5 utilizando uma solução alcalina (150 mL de 1M NaOH, 14 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e água destilada até 1 L). Sais biliares (HiMedia, Mumbai, Índia) e pancreatina (Êxodo Científica, SP, Brasil) foram adicionados até chegar a uma concentração de 10 g/L e de 1g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 1). Na última etapa, o pH foi ajustado para 7 usando a mesma solução alcalina. As concentrações de sais biliares e pancreatina foram ajustadas (10 g/L e 1 g/L, respectivamente), e as amostras novamente incubadas a 37°C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 2).

A enumeração de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi realizada através da retirada de 1mL de suco no tempo inicial (0 horas) e após 6 horas, usando diluições seriadas em 9 mL de Solução NaCl 0,9%. Alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri estéreis contendo MRS (55g/L) acrescido de Ágar (20 g/L). Após esse

período, a contagem foi realizada e o resultado expresso em logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de produto (log UFC/mL).

Para calcular a sobrevivência do micro-organismo, foi utilizada a seguinte equação:

$$S(\%) = \frac{\text{Log UFC N}_6}{\text{Log UFC N}_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

S (%) = Sobrevivência do micro-organismo (%);

Log UFC N<sub>6</sub> = Viabilidade do micro-organismo após exposição às condições gastrointestinais simuladas (6 h);

Log UFC N<sub>0</sub> = Viabilidade do micro-organismo antes da exposição às condições gastrointestinais simuladas (0 h).

## 5.7 Análise sensorial

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE/CCS (ANEXO A). Antes da análise ocorrer, alíquotas dos sucos foram submetidas às análises microbiológicas de *Salmonella* spp (AOAC, 2002, método 967.26) e coliformes termotolerantes g/ 45°C (AOAC, 2002, método 991.14) para garantir a qualidade sanitária (BRASIL, 2001).

O teste foi realizado com 120 (72 mulheres e 48 homens) provadores não-treinados, e as amostras oferecidas com 28 dias de estoque. Os julgadores receberam 30 mL de cada suco probiótico (não-fermentado e fermentado) servidos a temperatura de 4 °C, em recipientes brancos codificados aleatoriamente com números de três dígitos, e sua apresentação foi balanceada (STONE & SIDEL, 2004). Junto aos sucos, foram fornecidos água, o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B) e o formulário de aceitabilidade e intenção de compra (APÊNDICE A).

A ficha de aceitabilidade foi composta por uma escala hedônica do ideal com sete pontos, que iam do -3 (muito menos intenso do que o ideal) ao +3 (muito mais

intenso do que o ideal), para avaliar os atributos de doçura e acidez; uma escala hedônica de nove pontos, cujo ponto 1 correspondeu a “desgostei extremamente” e o ponto 9 a “gostei extremamente”, para avaliar a aceitabilidade de um modo geral; o teste de preferência, que consistiu circular o número da amostra que o provador preferiu; e por fim, uma escala hedônica de nove pontos para analisar a intenção de compra, cuja representação 1 correspondeu a “certamente não compraria” e 9 a “certamente compraria” (STONE & SIDEL, 2004).

### **5.8 Análise estatística**

Os valores médios foram obtidos a partir de testes em triplicatas para a viabilidade, e em duplicatas para o restante das análises realizadas. Os dados foram analisados através do teste estatístico de análise de variância ANOVA, ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0.05$ ), utilizando o programa “PAST” (HAMMER; HARPER & RYAN, 2001).

Para a análise sensorial, cada atributo foi analisado através de ANOVA, seguido do Teste de Tukey para comparação entre as medias obtidas, ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0.05$ ), utilizando o programa SAS®, e a análise multivariada dos atributos por Análise dos Componentes Principais (ACP), utilizando o programa Statistica 7.0.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Composição físico-química dos sucos probióticos

. Os valores médios da composição química dos sucos probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF) estão dispostos na Tabela 2. Os resultados para umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos, sólidos solúveis totais e valor energético total foram similares para ambos os sucos. No entanto, houveram diferenças significativas nos resultados de acidez titulável, vitamina C, carotenóides totais e compostos fenólicos.

**Tabela 2** – Composição físico-química dos sucos probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF).

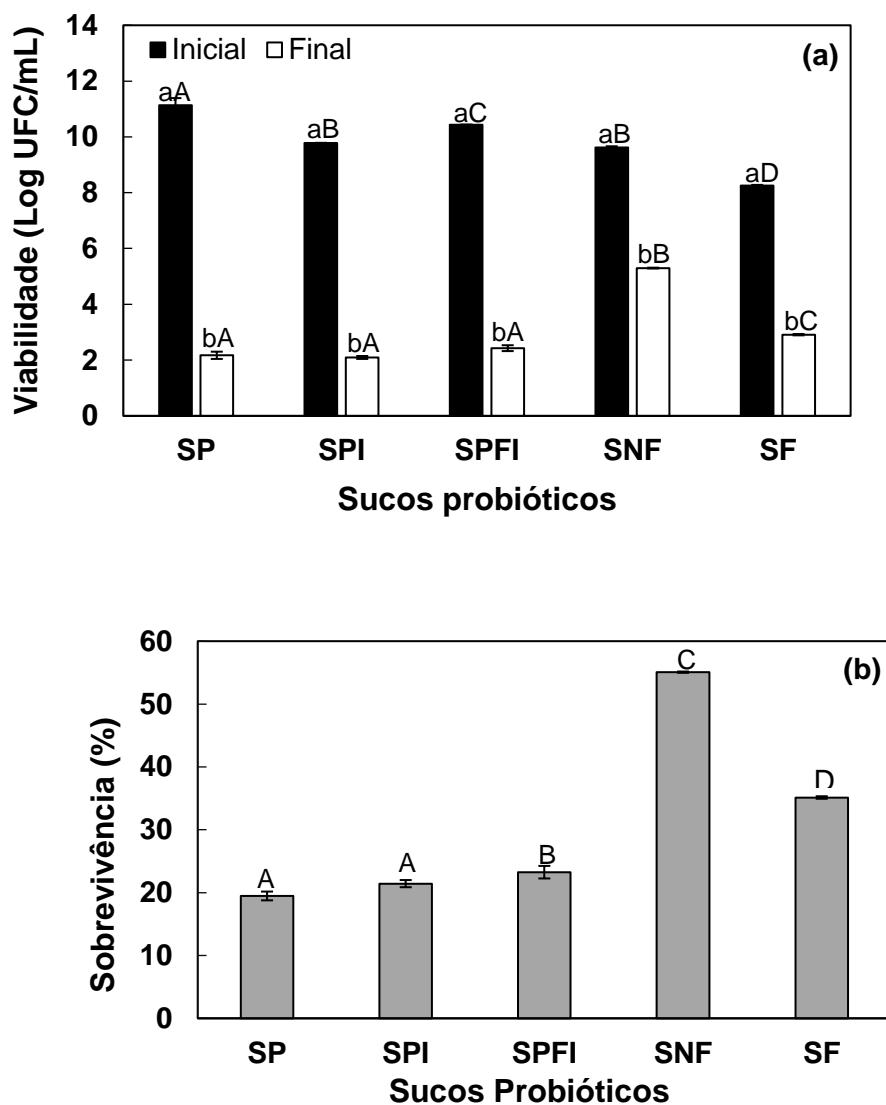
Composição	Sucos probióticos	
	SNF	SF
Umidade (g/ 100 g)	87,18 ± 0,00 <sup>a</sup>	87,21 ± 0,00 <sup>a</sup>
Cinzas (g/ 100 g m.s.) *	0,28 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,00 <sup>a</sup>
Proteína (g/ 100 g m.s.) *	0,35 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,10 <sup>a</sup>
Lipídios (g/ 100 g m.s.) *	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,11 <sup>a</sup>
Carboidratos (g/ 100 g m.s.) *	11,68 ± 0,00 <sup>a</sup>	11,55 ± 0,00 <sup>a</sup>
Sólidos solúveis totais (° Brix)	13,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	13,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Acidez titulável (g/ 100 g)	5,58 ± 0,40 <sup>a</sup>	10,33 ± 0,40 <sup>b</sup>
Vitamina C (mg/ 100 g)	42,31 ± 0,00 <sup>a</sup>	26,4 ± 5,01 <sup>b</sup>
Compostos fenólicos (mg E.A.G./ 100 mL) **	0,14 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,06 <sup>b</sup>
Carotenóides totais (mg/ 100 g)	833,33 ± 94,10 <sup>a</sup>	543,48 ± 36,12 <sup>b</sup>
Valor energético total (Kcal/ 100 mL)	52,60 ± 0,10 <sup>a</sup>	53,00 ± 0,60 <sup>a</sup>

\*m.s. matéria seca \*\*E.A.G. Equivalente Ácido Gálico

<sup>ab</sup> letras iguais na horizontal não diferem significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) entre si.

## 6.2 Sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 às condições gastrointestinais simuladas

Foram realizados ensaios de sobrevivência gastrointestinal simulada *in vitro* de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em cinco condições de suco de goiaba probióticos (Tabela 1). A viabilidade celular inicial e final e a taxa de sobrevivência são exibidas nas Figuras 4a e 4b, respectivamente.



**Figura 4** – Viabilidade inicial e final (a) e Sobrevivência (b) de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas em cinco sucos de goiaba probióticos: não fermentado, sem inulina e sem adoçante (SP); não-fermentado, com inulina e sem adoçante (SPI); fermentado, com inulina e sem adoçante (SPF1); não fermentado, com inulina e com Stevia (SNF); fermentado, com inulina e com Stevia (SF). Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre a mesma condição; diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre as condições.

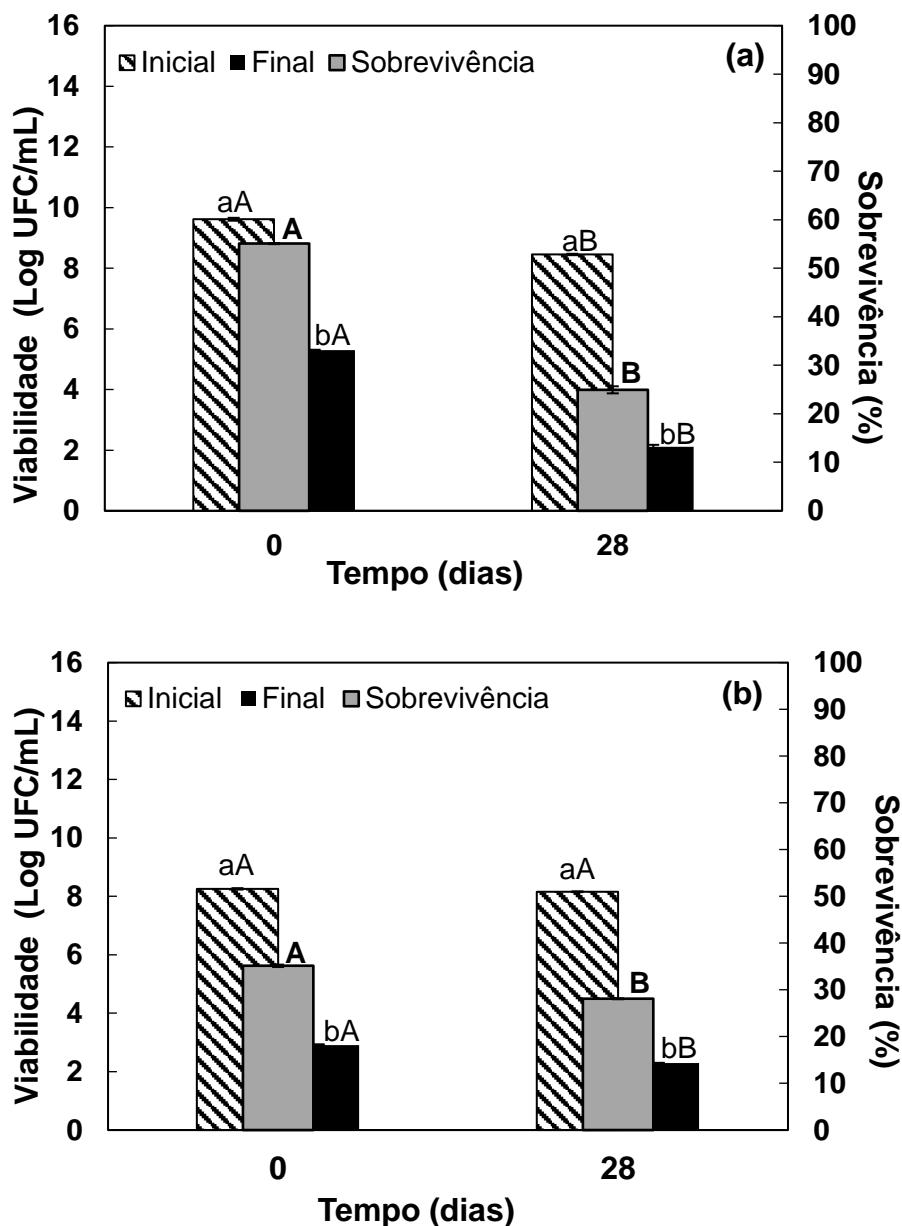
Além dos sucos probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF), sucos controles foram formulados: SP (não fermentado, sem inulina e sem adoçante), SPI (não-fermentado, com inulina e sem adoçante) e SPFI (fermentado, com inulina e sem adoçante). Houveram diferenças significativas entre os cinco sucos em relação à viabilidade inicial. Os sucos SP, SPI e SPFI não apresentaram diferença significativa entre si na viabilidade final, exibindo uma viabilidade menor do que 3 Log UFC/mL, enquanto os sucos SNF e SF apresentaram viabilidades finais de 5 e 3 Log UFC/mL, respectivamente. A taxa de sobrevivência só não foi significativa entre os sucos SP e SPI, que obtiveram valores em torno de 20 %. As maiores taxas de sobrevivência foram observadas nos sucos SNF (55 %) e SF (32 %).

Quando comparados os sucos SP e SPI, que diferem apenas na adição de inulina, verificou-se que houve aumento de 2 % na sobrevivência do micro-organismo, não sendo este aumento significativo. Já quando os sucos SP e SPFI são avaliados, há um aumento significativo de 4 % na sobrevivência no suco fermentado, com inulina e sem Stevia (SPFI). Entre os sucos SPI e SPFI, que se distinguem pelo processo fermentativo do SPFI, não houve aumento significativo (2 %).

O SNF exibiu um aumento na sobrevivência de 35 % em relação ao SP e SPI e de 32 % em relação ao SPFI. Já o SF apresentou um aumento de 12 % na sobrevivência em relação aos sucos SP e SPI, e de 9 % entre o SPFI. Entre os sucos que seriam estudados durante o estoque, o SNF apresentou um aumento de 23 % na sobrevivência em relação ao SF

### 6.3 Avaliações do estoque dos sucos probióticos

A Figura 5 apresenta a viabilidade inicial e final e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 após testes de condições gastrointestinais simuladas no suco não-fermentado (a) e suco fermentado (b) durante o estoque.

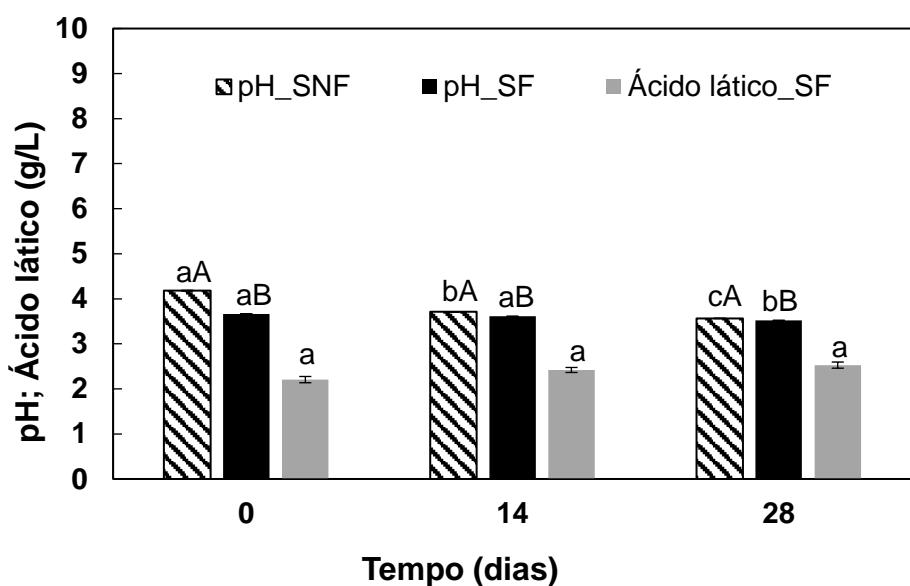


**Figura 5** – Viabilidade inicial e final e sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas em (a) suco não-fermentado (SNF) e (b) suco fermentado (SF) nos tempos inicial e final de estoque refrigerado. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) no mesmo dia; diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre os dias.

A viabilidade inicial do suco não-fermentado (SNF) foi de 9 Log UFC/mL, enquanto no suco fermentado (SF) a viabilidade foi 8 Log UFC/mL. Com 28 dias de armazenamento, o SNF apresentou uma redução de 12 %, enquanto o SF reduziu apenas 1 %. Ao final do estoque, ambos os sucos possuíam uma viabilidade de 8 Log UFC/mL.

No dia inicial de estoque, o SNF apresentou uma redução na viabilidade de 9 Log UFC/mL para 5 Log UFC/mL e 55 % de sobrevivência. Por outro lado, no dia 28 foi observada uma sobrevivência de 25 % (8 Log UFC/mL - 2 Log UFC/mL). O SF apresentou uma sobrevivência de 35 % no dia 0 de estoque, reduzindo sua viabilidade de 8 Log UFC/mL para 3 Log UFC/mL. Com 28 dias de estoque, houve uma diminuição da sobrevivência para 28 % (8 Log UFC/mL – 2 Log UFC/mL). Comparando as reduções nas sobrevivências entre os estoques, o SF apresentou uma redução de 21 % entre os dias 0 e 28, enquanto que o SNF apresentou uma redução de 55 % no mesmo período avaliado.

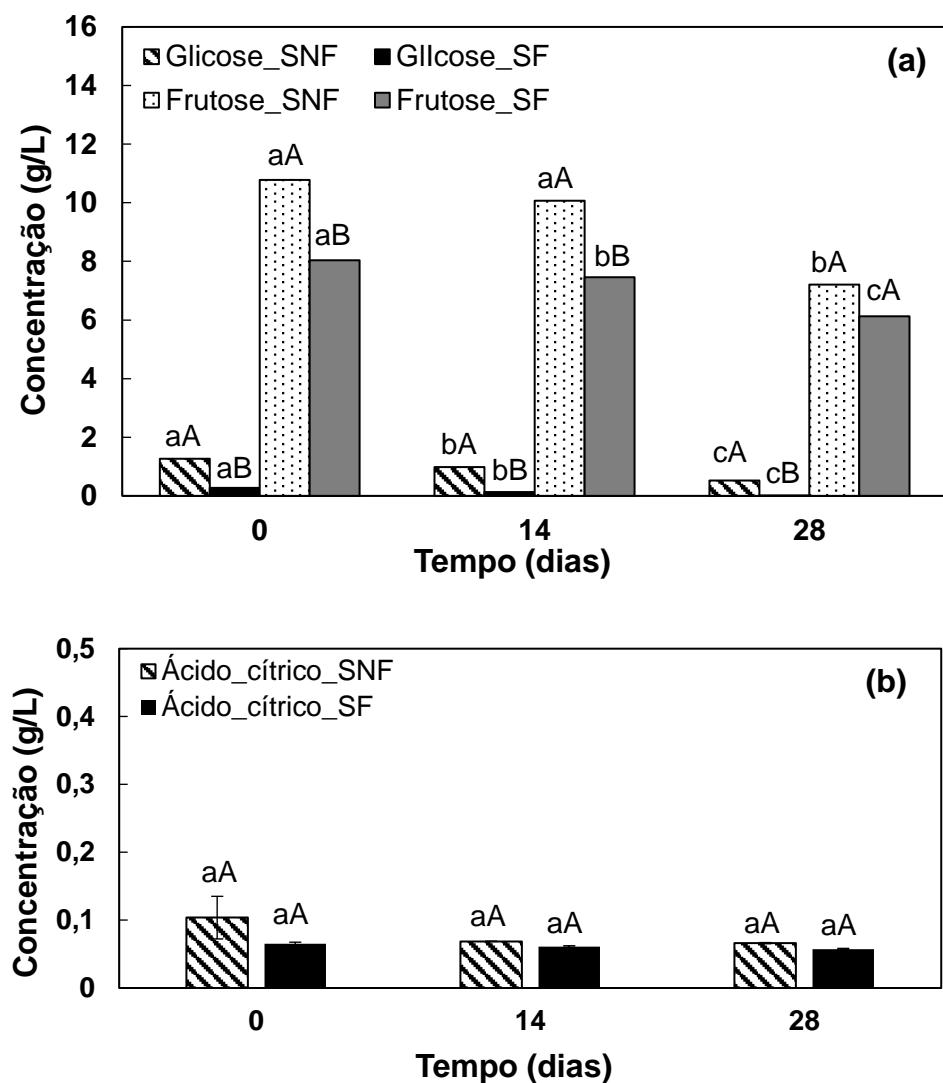
Os valores médios de pH e concentração de ácido lático estão dispostos na Figura 6.



**Figura 6** – Concentração de ácido lático e pH durante os estoques refrigerados dos sucos de goiaba probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF). Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) durante o tempo entre o mesmo estoque; diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre os estoques durante o tempo.

O pH do SNF apresentou uma redução de 11 % nos primeiros 14 dias (4,18 – 3,71) e de 4% entre 14 e 28 dias (3,71 – 3,56), apresentando uma variação total de 15 % durante o estoque. O pH do SF foi estável durante os 14 dias (3,66), reduzindo apenas 2,4 % com 28 dias (3,52). A produção de ácido lático durante a fermentação no SF foi de 2,2 g/L, e essa concentração se manteve estável durante o estoque.

Nas Figuras 7a e 7b observam-se as concentrações médias de glicose e frutose e ácido cítrico, respectivamente, durante o estoque refrigerado.



**Figura 7** – Concentrações de (a) glicose e frutose e (b) ácido cítrico durante os estoques refrigerados dos sucos de goiaba probióticos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF). Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) durante o tempo no mesmo estoque; diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) entre os estoques durante o tempo.

A concentração inicial de açúcares foi maior no SNF do que no SF, pois durante a fermentação do suco houve o consumo de 1 g/L de glicose e 2,7 g/L de frutose. Em relação a glicose, no SNF, houve uma redução de 59 % durante o armazenamento (1,26 – 0,52 g/L); no SF a redução foi de 95 % (0,27 - 0,01 g/L). A frutose também apresentou redução durante o estoque refrigerado em ambos os sucos, diminuindo sua concentração em 33 % no SNF (10,78 - 7,21 g/L), e 24 % no SF (8,03 - 6,12 g/L). A frutose apresentou um maior consumo se comparada a glicose, já que nos SNF e SF a concentração reduziu 3,6 g/L e 1,91 g/L, respectivamente; já a glicose teve sua concentração reduzida em 0,74 g/L e 0,26 g/L.

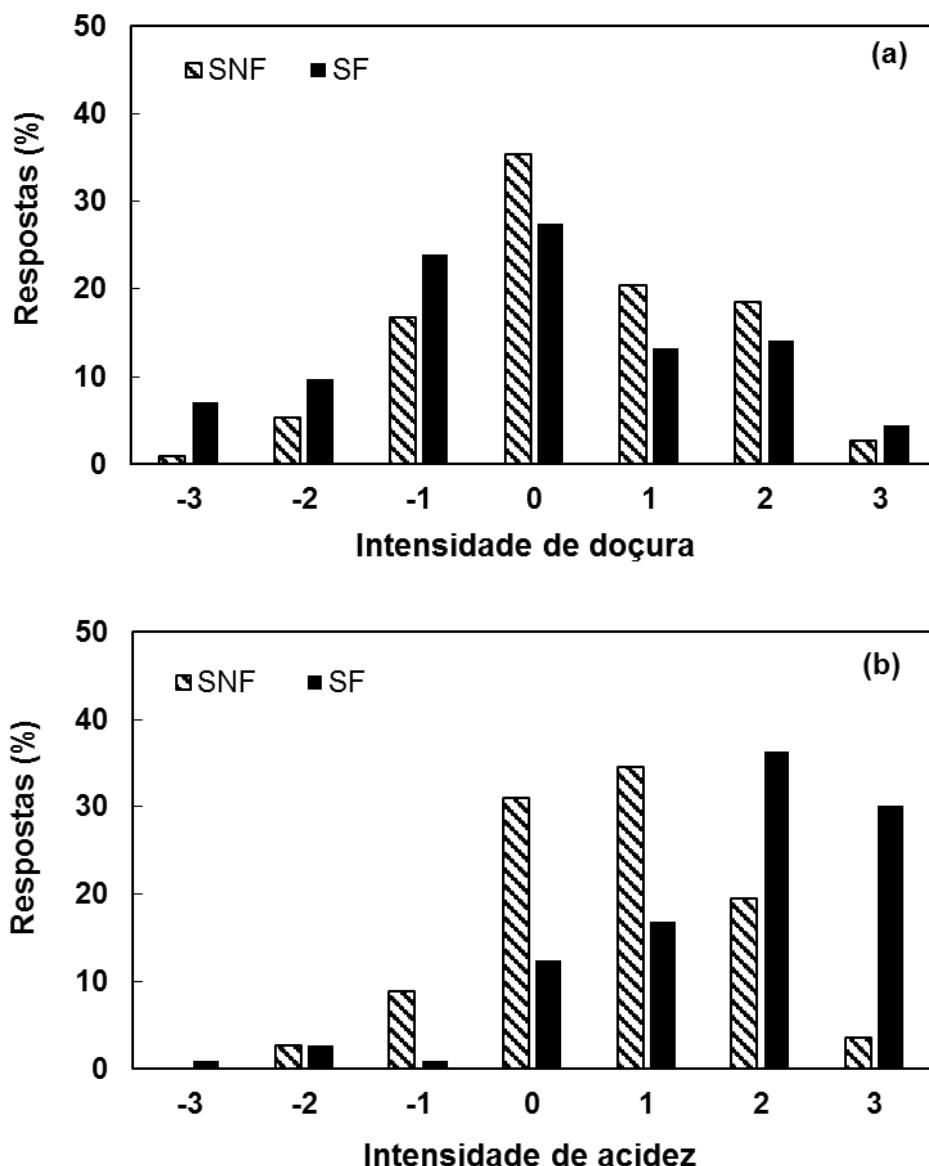
A concentração de ácido cítrico foi 0,06 g/L no início do estoque, não ocorrendo redução significativa durante os 28 dias para ambos os sucos.

. Na Tabela 3 encontram-se os valores médios dos atributos a partir das respostas obtidas. Sete formulários foram descartados devido ao preenchimento incorreto, sendo consideradas as notas de 113 (70 mulheres e 43 homens) dos 120 julgadores que participaram do teste. As respostas dos provadores na análise sensorial quanto a intensidade de doçura e acidez e aceitabilidade global e intenção de compra estão dispostas nos histogramas de frequências da Figura 8 e Figura 9, respectivamente.

**Tabela 3** – Médias das respostas obtidas nos testes de doçura, acidez, aceitação e intenção de compra dos sucos não-fermentado (SNF) e fermentado (SF).

AMOSTRAS	SNF	SF
Média de intensidade de doçura	0,68 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>
Média de intensidade de acidez	0,72 <sup>a</sup>	1,71 <sup>b</sup>
Média de aceitabilidade	6,21 <sup>a</sup>	4,28 <sup>b</sup>
Média de intenção de compra	6,16 <sup>a</sup>	4,23 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> letras diferentes na horizontal diferem significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) entre si.

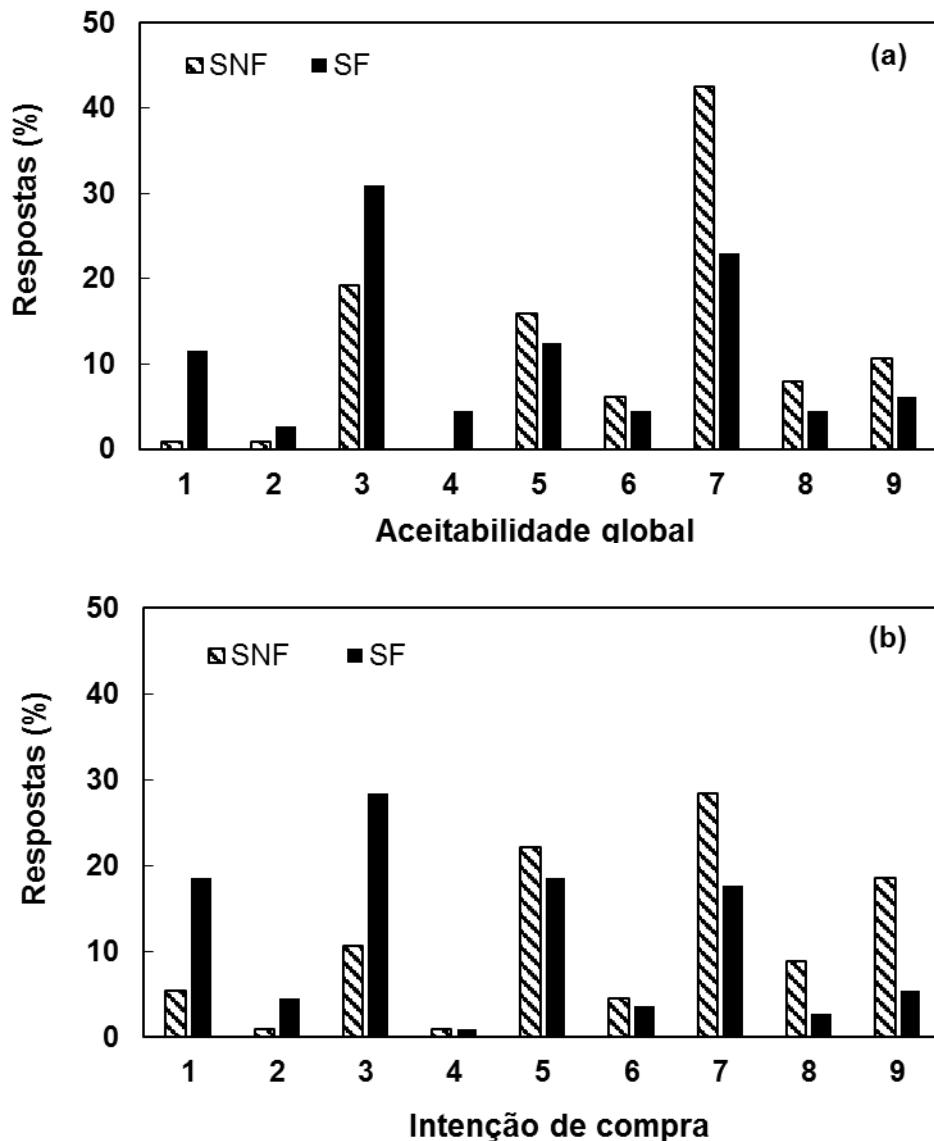


**Figura 8** – Histogramas de frequência com respostas de intensidade de doçura (a) e acidez (b) com escala do ideal variando do muito menos intenso (-3) ao muito mais intenso (3) do ideal.

Os dados do histograma para intensidade de doçura (Figura 8a) mostram que ambos os sucos apresentaram doçura próxima do ideal, já que o nível 0 (intensidade ideal) obteve o maior número de respostas. A média do SNF foi significativamente maior, sugerindo que essa amostra apresentou uma maior doçura em relação ao SF.

As respostas para intensidade de acidez (Figura 8b) das amostras sugeriram que ambas se apresentaram mais ácidas do ideal. O SNF teve o maior número de respostas no escore 1 (ligeiramente mais ácido do ideal), enquanto o SF obteve no

escore 2 (moderadamente mais ácido do ideal). A média do SF foi significativamente maior, sugerindo que essa amostra estava mais ácida em relação ao SNF.



**Figura 9** - Histogramas de frequência com respostas de aceitabilidade global (a) com escala hedônica que varia do desgostei extremamente (1) a gostei extremamente (9); e intenção de compra (b) com escala hedônica que varia de definitivamente não compraria (1) a definitivamente compraria (9).

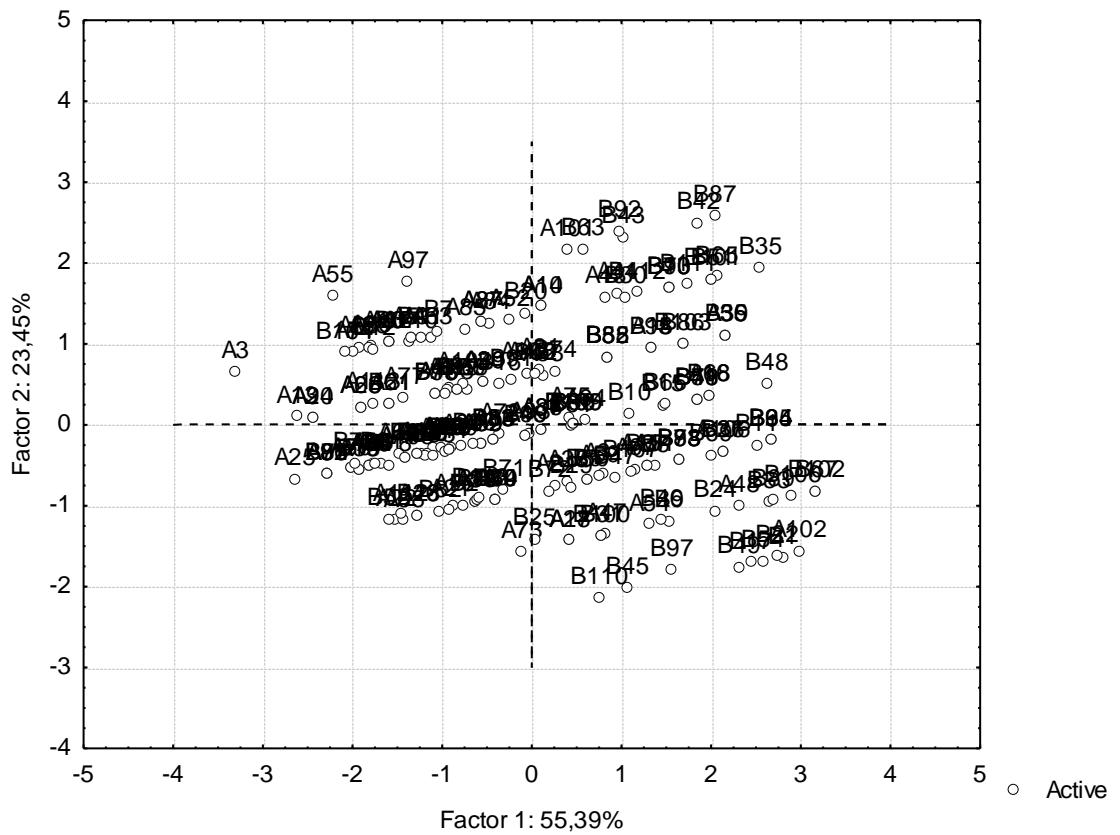
O maior número de respostas obtidas na aceitabilidade global (Figura 9a) para o SNF foi no escore 7 (42 %), enquanto para o SF foi no escore 3 (30 %). O SNF obteve uma média que corresponde a “gostei ligeiramente” na escala hedônica utilizada. Já o SF obteve uma média de 4,68 nesse mesmo atributo, o que corresponde a “nem gostei/nem desgostei” na escala. O SNF foi significativamente

melhor aceito pelos provadores do que o SF, indicando que houve uma preferência dos provadores pela amostra que apresentou intensidade mais doce e menos ácida.

Para a intenção de compra (Figura 9b), o SNF obteve mais respostas no escore 7 e o SF no escore 3. O SNF teve uma média de 6,16, resultando em uma média mais próxima ao escore 7, representando que a maioria dos provadores possivelmente comprariam o produto. Já o SF obteve uma média de 4,23, resultando em uma média mais próxima ao escore 5, o que representa uma possibilidade ou não de compra. Esses resultados estão de acordo com a aceitabilidade do produto, já que o SNF foi melhor aceito pelos provadores. Porém, o SF não foi rejeitado, já que existe a possibilidade ou não de compra do produto.

Em relação ao teste de preferência pareada realizado, o SNF obteve 84 respostas, enquanto o SF obteve 29 respostas. O número mínimo de julgadores necessário para estabelecer preferência de uma amostra sobre a outra ao nível de significância de 5 % era de 68 para a amostra com mais respostas (ROESSLER et al., 1978). Portanto, o SNF foi significativamente preferido em relação ao SF, e esse resultado corrobora com as maiores médias de aceitabilidade e intenção de compra que esse suco apresentou.

A análise multivariada dos atributos foi aplicada através da Análise dos componentes principais (APC) e seu resultado está demonstrado na Figura 10.



**Figura 10** – Análise dos componentes principais (ACP) executada com os quatro atributos (doçura, acidez, aceitabilidade global e intenção de compra) da análise sensorial.

A ACP não separou as respostas dos 113 julgadores considerando as quatro variáveis. Isto significa que os sucos não apresentam diferença significativa quando os atributos foram analisados ao mesmo tempo.

## 7. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi observado que o suco fermentado (SF) apresentou maior estabilidade em relação ao suco não-fermentado (SNF), o que sugere que para a elaboração de um suco de goiaba probiótico contendo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, a fermentação foi um método que garantiu a propriedade funcional do produto.

A composição centesimal (Tabela 2) foi similar para ambos os sucos, e considerando uma porção de 200 mL, os sucos atingiriam 5,3 % das calorias diárias recomendadas (BRASIL, 2003 b). Os teores de sólidos solúveis totais e acidez titulável estão acima do valor mínimo exigido em sucos de goiaba adoçados, que é de 11° Brix e 0,12 g/ 100 g, respectivamente (BRASIL, 2003 a). Em relação a acidez titulável, houve uma diferença significativa entre os sucos em razão da produção de ácido lático no SF.

A vitamina C também está acima do exigido pela legislação (26 mg/ 100 g) em ambos os sucos. O menor valor encontrado no SF deve-se ao fato que essa vitamina é rapidamente destruída pela ação da luz e é instável com aumento de temperatura (FERNANDES et al, 2007). Em trabalhos anteriores, a quantidade de vitamina C em sucos de goiaba não-fermentados variou de 27,3 mg/ 100 g (SILVA et al., 2016) a 62,3 mg/ 100 g (ORDÓÑEZ-SANTOS & VÁZQUEZ-RIASCOS, 2010) e essa variação é influenciada pelo grau de maturação da fruta, métodos de elaboração da bebida e quantidade de polpa utilizada, acarretando na perda da vitamina C (FERNANDES et al., 2011).

Os compostos fenólicos e carotenóides totais também apresentaram diferenças significativas entre o SNF e SF. Esses compostos são substâncias antioxidantes, que podem sofrer reduções em altas temperaturas (SILVA et al., 2016), e a temperatura da fermentação pela qual o SF foi mantido durante 24 horas pode ter sido a causa pelos valores menores encontrados em relação ao SNF. Os resultados para compostos fenólicos foram similares ao encontrado por Silva et al. (2016) em suco de goiaba não-fermentado (0,13 mg/ 100 g); já para os carotenóides totais (177,6 mg/ 100 g), o valor foi bem menor comparado ao presente estudo. No entanto, houve a adição de Stevia nos sucos elaborados, e por possuir alta quantidade de compostos

antioxidantes (BARBA; GRIMI & VOROBIEV, 2015; BARROSO et al., 2016), esse adoçante pode ter aumentado a concentração de carotenóides totais.

Para o estudo dos sucos probióticos não-fermentado e fermentado, era necessária a realização de ensaios de sobrevivência gastrointestinal simuladas com outras condições controle (dispostos na Tabela 1), a fim de observar a influência da inulina e Stevia. A razão para a escolha desse tipo de ensaio é que para ser considerado efetivo, o micro-organismo deve sobreviver às condições gástricas e entéricas, e testes de simulação gastrointestinal *in vitro* podem ser facilmente aplicados para garantir a qualidade da cultura probiótica (TUOMOLA et al., 2001).

Analizando os sucos probióticos SP e SPI (Figuras 4a e 4b), verificou-se que a adição de inulina (5 g/L) não apresentou efeito positivo ou negativo na viabilidade e sobrevivência. Hekmat, Soltani & Reid (2009) verificaram que a adição de inulina (4 g/L) em iogurte também não aumentou a viabilidade de *L. rhamnosus* GR-1 durante 28 dias, comparado com o iogurte sem este prebiótico. Uma vez que a inulina não inibiu o crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469, como no caso da linhagem *L. rhamnosus* (PARKAR et al., 2010) usando a mesma concentração do presente trabalho, o uso desse prebiótico pode ser considerado adequado devido aos seus benefícios com relação à inibição da adesão de patógenos, aumento da adesão de bactérias lácticas e da absorção de minerais (SAULNIER et al., 2009; PARKAR et al., 2010; AI-GHAZZEWI & TESTER, 2014).

Em relação à fermentação, a sobrevivência do micro-organismo no SPFI foi maior do que os sucos SP e SPI, independentemente da adição de inulina. A produção de compostos antimicrobianos durante a fermentação, especialmente o ácido lático, pode contribuir para uma maior tolerância aos valores de pH gástrico e intestinal (RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010). Apesar de existirem outras técnicas mais modernas para utilização de probióticos, os alimentos fermentados ainda apresentam grande relevância por influenciar na propriedade nutricional do alimento, aumento a biodisponibilidade e atividade de nutrientes, além de oferecer novos aromas e sabores para o produto (HUGENHOLTZ, 2013; SELHUB, LOGAN & BESTED, 2014).

A adição de Stevia aumentou a sobrevivência do micro-organismo quando comparados os sucos SPI e SNF (não-fermentados) e os sucos SPFI e SF

(fermentados). Uma possível explicação para esse aumento é devido a Stevia possuir uma alta atividade antioxidante (THOMAS & GLADE, 2010), protegendo a membrana celular de possíveis danos (SHAH et al., 2010). Além desse efeito positivo observado, a Stevia já vem sendo utilizada pela indústria alimentar como estratégia para diminuir o consumo de açúcar e adoçantes sintéticos, justificando sua utilização nos produtos funcionais elaborados (BARBA, GRIMI & VOROBIEV, 2015; BARROSO et al., 2016).

Houveram diferenças significativas entre as viabilidades inicial e final para o SNF e SF (Figuras 5a e 5b), assim como entre a sobrevivência em 0 e 28 dias para ambos os sucos probióticos. Apesar do SNF apresentar viabilidade e sobrevivência maior no primeiro dia do estoque, o SF foi mais estável, já que sofreu uma variação menor desses parâmetros após 28 dias de estoque. A estabilidade observada no SF foi devido ao *stress* do processo fermentativo, já que o pH final foi menor que 4. A pré-adaptação ao *stress* aumenta a viabilidade dos probióticos sob condições gastrointestinais simuladas (MATHIPA & TANTSCHA, 2015) e a fermentação pode colaborar para a produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas, garantindo a estabilidade do produto durante a vida de prateleira (RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010).

A fruta e espécie escolhidas para a elaboração de sucos fermentados irão influenciar na viabilidade inicial e final de estoque do produto. Costa et al. (2013), ao estudarem suco de abacaxi fermentado com *L. casei*, encontraram viabilidade inicial de 8 Log UFC/mL, reduzindo para 6 Log UFC/mL com 28 dias; Mousavi et al. (2011) fermentaram o suco de romã com quatro espécies (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *L. delbruekii*) separadamente, e verificaram que a viabilidade inicial foi de 8 Log UFC/mL em todos os sucos, porém após 21 dias todos perderam a viabilidade. Portanto, o suco de goiaba fermentado com *L. rhamnosus* ATCC 7469 pode ser um produto funcional eficiente.

Comparando a taxa de sobrevivência do SF obtida nesse estudo com o relatado por Farias, Soares & Gouveia (2016) pela mesma espécie, mas utilizando o suco fermentado de Maracujá da Caatinga, a alta sobrevivência nesse último caso (cerca de 90%) foi devido às condições mais amenas utilizadas na simulação gastrointestinal. Esses autores utilizaram um pH gástrico de 2,7; não houve a adição de bile e o processo ocorreu sem agitação.

Durante o estudo de vida de prateleira, não houve uma estabilidade do pH do SNF, havendo uma diminuição significativa, enquanto o pH do SF se manteve estável durante todo o estoque. Essa redução de pH no SNF não foi associada a produção de ácido lático, visto que através da CLAE não foi observada a presença deste ácido. De acordo com Ding & Shah (2008) células probióticas mortas são capazes de liberar enzimas para hidrolisar açúcares em sucos de frutas, reduzindo assim o pH.

Mesmo com as reduções de pH, o micro-organismo se manteve viável nos dois sucos probióticos durante o estoque, indicando que a linhagem escolhida consegue sobreviver em sucos de frutas ácidas. Em trabalhos anteriores, *L. rhamnosus* ATCC 7469 se manteve viável durante 28 dias em suco fermentado de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*) com pH em torno de 4 (FARIAS; SOARES & GOUVEIA, 2016), e durante 21 dias em suco de cereja (*Cornus mas* L.) com pH 3,5 (NEMATOLLAHI et al., 2016). Nesse último trabalho, os pesquisadores relataram que o baixo pH e a alta concentração de compostos fenólicos (216,2 mg E.A.G. /mL) no suco de cereja tiveram um efeito negativo na viabilidade do micro-organismo durante o armazenamento refrigerado. No presente estudo, os sucos apresentaram valores maiores de pH e um conteúdo menor de compostos fenólicos, o que pode ter contribuído para uma maior sobrevivência ao longo do estoque.

O ácido lático produzido durante a fermentação do SF se manteve durante o estoque. Esse ácido é um agente antimicrobiano, tornando-se vantajoso o consumo de uma bebida que já o possui. Nesse estudo, a produção foi de 2,2 g/L, e comparando com o estudo de Farias, Soares & Gouveia (2016), que utilizaram a mesma cepa, a produção foi de 6g/L, porém utilizando outra fruta (Maracujá da Caatinga) e quantidades de polpa e inóculo (14,45 % v/v e 2,91% v/v, respectivamente) diferentes desse trabalho, o que pode interferir na concentração final deste ácido.

Analizando as médias obtidas da concentração dos açúcares glicose e frutose em ambos os sucos (Figura 7a), houve diferença no dia inicial de estoque, já que o SF apresentou uma quantidade menor desses carboidratos, pois são uma fonte de energia para o micro-organismo durante o processo fermentativo (GOLDFEIN & SLAVIN, 2015). Houve o consumo dos açúcares durante o estoque do SF, porém foi menor se comparado ao consumido no processo fermentativo, devido a baixa temperatura (4°C) de armazenamento. Comparando o consumo de açúcares entre os sucos durante o estoque, foi observado que no SNF ocorreu um consumo significativo

no 28º dia; No SF também houve um consumo durante o estoque, porém foi menor se comparado ao SNF, corroborando com outros parâmetros já discutidos que sinalizam uma maior estabilidade da cepa no suco fermentado.

A redução de açúcares também indica que a bactéria não foi capaz de metabolizar a inulina, pois caso isso tivesse acontecido, era esperado um aumento na concentração de carboidratos livres (NUALKAEKUL; SALMERON & CHARALAMPOPOULOS, 2011). Algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de hidrolisar os fruto-oligossacarídeos (FOS) através da produção da enzima frutofuranosidase (OLIVEIRA et al., 2012) e em estudos anteriores já foi visto que *L. paracasei* e *L. rhamnosus* GG foram capazes de fermentar esse prebiótico e produzirem ácido láctico e acético (BERNAT et al., 2014; RUBEL et al., 2014). A vantagem de um produto que possui o probiótico e uma fibra não-fermentável por essa cepa é que não terá alterações sensoriais ao longo do armazenamento, pois a fermentação de prebióticos gera os ácidos graxos de cadeia curta, que possuem sabores desagradáveis (SPELBRINK et al., 2015).

A concentração média de ácido cítrico (Figura 7c) não diferiu entre os sucos durante o armazenamento, sugerindo que esse ácido não foi metabolizado pela bactéria durante o estoque (NUALKAEKUL & CHARALAMPOPOULOS, 2011). O ácido cítrico é considerado um conservante, que tem forte influência na estabilidade de compostos bioativos em produtos (PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2015).

Ainda não existem estudos com análise sensorial feitos com sucos de goiaba sob as mesmas condições dessa pesquisa. No estudo de Ellendersen et al. (2011), 96% dos provadores não-treinados julgaram o suco de maçã fermentado como “gostei muito”; Já Zheng et al. (2014) verificaram que após 4 semanas de estoque de suco de lichia fermentado, a aceitabilidade global foi de 5, utilizando um painel de 15 provadores treinados. Esses resultados mostram que é difícil comparar estudos de análise sensorial, uma vez que existem muitas variáveis que podem interferir nos resultados da aceitação do produto, como idade, sexo, hábitos alimentares e culturais e conhecimentos sobre os benefícios dos probióticos (LUCKOW & DELAHUNTY, 2004).

Foram observadas diferenças significativas entre todos os atributos testados na análise sensorial dos dois sucos probióticos. De modo geral, o SNF foi melhor

aceito e preferido pelos julgadores, sugerindo a preferência por bebidas mais doces e menos ácidas. A adição de Stevia ao SF não foi capaz de reduzir o sabor ácido causado pela fermentação do produto, porém, o SF não foi totalmente rejeitado, já que tanto a nota da aceitabilidade e intenção de compra estão próximas do escore 5, o que indica, pela escala hedônica, que o produto pode ou não ser aceito ou comprado pelo consumidor. Além disso, quando os dois sucos foram submetidos a análise multivariada (ACP) não houve separação dos atributos, indicando que não houve diferença significativa entre os sucos probióticos, sugerindo assim que o SF pode ser aceito e consumido.

## 8. CONCLUSÕES

- A adição de inulina e Stevia não afetou a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469, podendo ser adicionados aos sucos;
- O suco de goiaba pode ser considerado um veículo alimentar adequado para a inclusão de *L. rhamnosus* ATCC 7469, já que tanto o suco não-fermentado quanto o fermentado apresentaram viabilidades adequadas durante o período de armazenamento estudado;
- Como o suco probiótico de goiaba fermentado (SF) foi mais estável durante o estoque, possuiu o ácido láctico em sua composição, apresentou um escore que indicou possibilidade de compra e não obteve diferença significativa do suco não-fermentado (SNF) quando todos os atributos da análise sensorial foram julgados ao mesmo tempo, conclui-se que o suco fermentado (SF) pode ser utilizado como um potencial alimento funcional.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente estudo demonstrou que a adição de inulina não comprometeu o produto, porém, é necessário estudar a relação desse prebiótico com o probiótico na elaboração de um alimento funcional, já que a quantidade utilizada pode influenciar na sobrevivência do micro-organismo;
- São importantes maiores estudos para comprovar a eficácia da Stevia em aumentar a sobrevivência gastrointestinal de micro-organismos, pois seria uma outra vantagem da utilização desse adoçante pela indústria e população;
- Por fim, a bebida probiótica fermentada à base de goiaba pode ter seus atributos sensoriais melhorados, principalmente a acidez, para que exista a possibilidade de maior aceitação e compra do produto pelo mercado consumidor.

## REFERÊNCIAS

ABAD, C.L.; SAFDAR, N. The Role of *Lactobacillus* Probiotics in the Treatment or Prevention of Urogenital Infections – A Systematic Review. **Journal of Chemotherapy**, vol. 21, n. 3, p. 243-252, 2009.

AIDOO, R.P.; AFOAKWA, E.O.; DEWETTINCK, K. Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 62, p. 592-597, 2014.

AL-GHAZZEWI, F.H.; TESTER, R.F. Inhibition of the adhesion of *Escherichia coli* to human epithelial cells by carbohydrates. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber**, vol. 4, p. 1-5, 2014.

ÁLVAREZ-BORROTO, C.R.; RUANO-NIETO, C.A.L.; CALLE-MIÑACA, M.R.; LARA-FIALLOS, M.V. Extraction and determination of inulin from common autochthonous garlic (*Allium sativum*). **Revista Cubana Química**, vol. 27, n. 2, p. 131-146, 2015.

AMARA, A.A.; SHIBL, A. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 23, p.107-114, 2015.

ARORA, M.; BALDI, A. Regulatory categories of probiotic across the globe: A review representing existing and recommended categorization. **Indian Journal of Medical Microbiology**, vol. 33, n. 5, p. 2-10, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 13 ed., Washington, AOAC, 2002.

BAKR, S.A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 4, p. 423-431, 2015.

BARBA, F.J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Reviews**, vol. 7, n. 1, p. 45-62, 2015.

BARROSO, M.; BARROS, L.; RODRIGUES, M.A.; SOUSA, M.J.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R. *Stevia Rebaudiana* Bertoni cultivated in Portugal: A prospective study of its antioxidant potential in different conservation conditions. **Industrial Crops and Products**, vol. 90, p. 49-55, 2016.

BHAT, R.; SURYANARAYANA, L.C.; CHANDRASHEKARA, K.A.; KRISHNAN, P.; KUSH, A.; RAVIKUMAR, P. *Lactobacillus plantarum* mediated fermentation of *Psidium guajava* L. fruit extract. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 119, n. 4, p. 430-432, 2015.

BEDANI, R.; VIEIRA, A.D.S.; ROSSI, E.A.; SAAD, S.M.I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 55, p. 436-443, 2014.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 126, p. 278-285, 2008.

BERNAT, N.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ. Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 49, p. 2553-2562, 2014.

BLATCHFORD, P., ANSELL, J., GODOY, M.R.C., FAHEY, G., GARCIA-MAZCORRO, J.F., GIBSON, G.R. et al. Prebiotic mechanisms, functions and applications – A review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, vol. 8, n. 4, p. 109-132, 2013.

BRASIL, 2001. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b). Acesso em: 03 de janeiro de 2017.

BRASIL, 2003 a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003. **Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultaLegislacao.do?opercao=visualizar&id=2831>. Acesso em 07 de julho de 2016.

BRASIL, 2003 b. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 360, 23 de dezembro de 2003. **Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional**. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res360\\_23\\_12\\_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc). Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

BRASIL, 2007. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 33, de 25 de outubro de 2007. **Hidróxido de sódio – INS 524**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/publicacao>. Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

BRASIL, 2008 a. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, 24 de março de 2008. **Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos**. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Microsoft%2BWord%2B- %2BResolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn%25C2%25BA%2B18%25 2C%2Bde%2B24%2Bde%2Bmar%25C3%25A7o%2Bde%2B2008.pdf/4b266cfdb-28bc-4d60-a323-328337bfa70e?version=1.0>. Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

BRASIL, 2008 b. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

BRASIL, 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **A cultura da goiaba – 2ª edição**.

BRASIL, 2012. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Agrícola Municipal**.

BRASIL, 2014. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. **Programa AliceWeb**. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017.

BRASIL, 2016. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em 20 de dezembro de 2016.

BOSSCHER, D.; VAN LOO, J.; FRANCK, A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. **Nutrition Research Reviews**, vol. 19, p. 216-226, 2006.

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

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**, vol. 137, p. 121-129, 2010.

CEAPA, C.; WOPEREIS, H.; REZAIKI, L.; KLEEREBEZEM, M.; KNOL, J.; OOZER, R. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, vol. 27, p. 139-155, 2013.

CÉSPEDES, M.; CÁRDENAS, P.; STAFFOLANI, M.; CAPIANNI, M.C.; VINDEROLA, G. Performance in Nondairy Drinks of Probiotic *L. casei* Strains Usually Employed in Dairy Products. **Journal of Food Science**, vol. 78, n. 5, p. 756-762, 2013.

CHATURVEDULA, V.S.P.; UPRETI, M.; PRAKASH, I. Structures of the novel a-glucosyl linked diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. **Carbohydrate Research**, vol. 346, p. 2034-2038, 2011.

CHEN, H., BAO, C., SHU, G., WANG, C. Response surface methodology for optimizing fermentation conditions of goat yogurt with *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus casei*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, vol. 28, ed. 8, p. 547-553, 2016.

COSTA, V.M. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido láctico. Dissertação de Mestrado apresentada na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, Piracicaba, 2006,65 p.

COSTA, M.G.M., FONTELES, T.V., JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, vol. 139, p. 261–266, 2013.

COSTA, G.M.; SILVA, J.V.C.; MINGOTTI, J.D.; BARÃO, C.E.; KLOSOSKI, S.J.; PIMENTEL, T.C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 75, p. 195-201, 2017.

DALIRI, E.B.; LEE, B.H. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science and Human Wellness**, vol. 4, p. 56-65, 2015.

DELLA TORRE, S.B.; KELLER, A.; DEPEYRE, J.L.; KRUSEMAN, M. Sugar-sweetened beverages and obesity risk in children and adolescents: A systematic

analysis on how methodological quality may influence conclusions. **Journal of The Academy of Nutrition and Dietetics**, vol. 116, n. 4, p. 638-659, 2016.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juice. **International Food Research Journal**, vol. 15, p. 219-232, 2008.

DIPJYOTI, C.; SOURANGSHU, C.; MOHANASRINIVASAN, V. Fermentation of Psidiumguajava Juice by using probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, vol. 5, n. 5, p. 1-9, 2015.

DOUILLARD, F.P.; RIBBERA, A.; KANT, R.; PIETILÄ, T.E.; JÄRVINEN, H.M.; MESSING, M. et al. Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Strain GG. **PLOS Genetics**, vol. 9, n. 8, p. 1-15, 2013.

DUNCAN, S.H.; FLINT, H.J. Probiotics and prebiotics and health in ageing population. **Maturitas**, vol. 75, p. 44-50, 2013.

ELLENDERSEN, L.S.; GRANATO, D.; GUERGOLETTA, K.B.; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering Life and Science**, vol. 12, n. 4, p. 1-11, 2012.

FARIAS, N.; SOARES, M.; GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 71, p. 149-54, 2016.

FAO/WHO. (2002). Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

FERNANDES, A.G.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W.; PRADO, G.M. Comparação dos teores em vitamina c, carotenóides totais, antocianinas totais e fenólicos totais do suco tropical de goiaba nas diferentes etapas de produção e influência da armazenagem. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, vol. 18, n. 4, p. 431-438, 2007.

FERNANDES, A.G.; SANTOS, G.M.; SILVA, D.S.; SOUSA, P.H.M.; MAIA, G.A.; FIGUEIREDO, R.W. Chemical and physicochemical characteristics changes during passion fruit juice processing. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos Campinas**, vol. 31, n. 3, p. 747-751, 2011.

FONG, F.L.Y.; SHAH, N.P.; KIRJAVAINEN, P.; EL-NEZAMI, H. Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. **International Reviews of Immunology**, vol. 35, n. 3, p. 179-188, 2015.

FORD, A.C.; QUIGLEY, E.M.M.; LACY, B.E.; LEMBO, A.J.; SAITO, Y.A.; SCHILLER, L.R. et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: Systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Gastroenterology**, vol. 109, p. 1547-1561, 2014.

FUNCTIONAL FOOD CENTER (FFC), 2014. **Definition for functional foods**. 17<sup>th</sup> International Conference, San Diego, Califórnia, USA. Disponível em: <http://functionalfoodcenter.net/>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOON, N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 69, p. 365–371, 2016.

GOLDFEIN, K.R.; SLAVIN, J.L. Why Sugar Is Added to Food: Food Science 101. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 14, p. 644-656, 2015.

GUPTA, E.; PURWAR, S.; SUNDARAM, S.; RAI, G.K. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 7, n. 46, p. 3343-3353, 2013.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, vol. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HEKMAT, S.; SOLTANI, H.; REID, G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, vol. 10, p. 293–296, 2009.

HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; RAVIKUMAR, R.; CARVALHO, I.S. Mechanism of action of probiotics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 56, n. 1, p. 113-119, 2013.

HEMPEL, S.; NEWBERRY, S.J.; MAHER, A.R.; ZHEN, W.; MILES, J.N.V.; SHANMAN, R. et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-

associated diarrhea a systematic review and meta-analysis. **American Medical Association**, vol. 307, n. 18, p. 1959-1969, 2012.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and importance features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 73, p. 365-373, 2001.

HUGENHOLTZ, J. Traditional biotechnology for new foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 24, p. 155-159, 2013.

INDUSTRYARC. Global Stevia / Stevia rebaudiana Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. **Industry ARC**. 2014. Disponível em: <http://industryarc.com/Domain/2/agriculturemarket-research.html>. Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**, São Paulo, SP, ed. IV, p. 1020 (2008).

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

LI, R.; ZHANG, POLK, D.B.; TOMASULA, P.M.; YAN, F.; LIU, L. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. **Journal of Controlled Release**, vol. 230, p. 79-87, 2016.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, vol. 15, n. 7-8, p. 751-759, 2004.

LUCKOW, T.; SHEEHAN, V.; FITZGERALD, G.; DELAHUNTY, C. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. **Appetite**, vol. 47, p. 315–323, 2006.

MARHAMATIZADEH, M.H.; REZAZADEH, S.; KAZEMEINI, F.; KAZEMI, M.R. The Study of Probiotic Juice Product Conditions Supplemented by Culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **Middle-East Journal of Scientific Research**, vol. 11, n. 3, p. 287-295, 2012.

MARTINS, E.M.F.; RAMOS, A.M.; VANZELA, E.S.L.; STRINGHETA, P.C.; PINTO, C.L.O; MARTINS, J.M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, vol. 51, p. 764-770, 2013.

MATHIPA, M.G.; THANTSHA, M.S. Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Gut Pathogens**, vol. 7, p. 1-14, 2015.

MOUSAVI, Z.E.; MOUSAVI, S.M.; RAZAVI, S.H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIAMI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 27, p. 123-128, 2010.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; NICOLAUS, B.; POLI, A.; ORLANDO, P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under

simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, vol. 18, p. 28-285, 2012.

NEMATOLLAHI, A.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 21, p. 49-53, 2016.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 146, p. 111-117, 2011.

NUALKAEKUL, S.; SALMERON, I.; CHARALAMPOPOULOS, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**, vol. 129, p. 1037-1044, 2011.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophiles*. **LWT – Food Science and Technology**, vol. 47, p. 358-363, 2012.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L.E.; VÁZQUEZ-RIASCOS, A. Effect of processing and storage time on the vitamin C and lycopene contents of nectar of pink guava (*Psidium guajava* L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, vol. 60., n. 3, p. 280-284, 2010.

PARKAR, S.G.; REDGATE, E.L.; WIBISONO, R.; LUO, X.; KOH, E.T.H.; SCHRODER, R. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. **Journal of Functional Foods**, vol. 2, p. 210-218, 2010.

PÉREZ-RAMÍREZ, I.F.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; RAMÍREZ-DE LEÓN, J.A.; ROCHA-GUZMÁN, N.E.; REYNOSO-CAMACHO, R. Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Food Chemistry**, vol. 172, p. 885–892, 2015.

PIMENTEL, T.C.; MADRONA, G.S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S.H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 63, p. 415-422, 2015.

PITINO, I.; RANDAZZ, C.L.; MANDALARI, G.; LO CURTO, A.; FAULKS, R.M.; LE MARC, Y. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. **Food Microbiology**, vol. 27, p. 1121-1127, 2010.

RAMIREZ-VÉLEZ, R.; OJEDA, M.L.; TORDECILLA, M.A.; PEÑA, J.C.; MENESES, J.F. El consumo regular de bebidas azucaradas incrementa el perfil lipídico-metábolico y los niveles de adiposidad em universitários de Colombia. **Revista Colombiana de Cardiología**, vol. 23, n. 1, p. 11-18, 2016.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy, **Food Research International**, vol. 43, p. 1-7, 2010.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, vol. 27, p. 1-11, 2010.

ROESSLER, E. B., PANGBORN, R. M., SIDEL, J. L., STONE H. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. **Journal of Food Science**, vol. 43, p. 940-947, 1978.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **A guide to carotenoids analysis in food**, OMRI Res., Washington, DC, p. 64 (2001).

ROLIM, F.R.L., SANTOS, K.M.O., BARCELOS, S.C., EGITO, A.S., RIBEIRO, T.S., CONCEIÇÃO, M.L. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT – Food Science and Technology**, vol. 63, p. 807-813, 2015.

RUBEL, I. A.; PÉREZ, E.E.; GENOVESE, D.B.; MANRIQUE, G.D. *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. **Food Research International**, vol. 62, p. 59-65, 2014.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 46, p. 1-16, 2006.

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

SAULNIER, D.M.A.; SPINLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 20, p. 135-141, 2009.

SELHUB, E.M.; LOGAN, A.C.; BESTED, A.C. Fermented foods, microbiota, and mental health: Ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of Physiological Anthropology**, vol. 33, n. 2, p. 1-12, 2014.

SHAH, N.P.; DING, W.K.; FALLOURD, M.J.; LEYER, G. Improving the Stability of Probiotic Bacteria in Model Fruit Juices Using Vitamins and Antioxidants. **Journal of Food Science**, vol. 75, n. 5, p. 278-282, 2010.

SHIVANNA, N.; NAIKA, M.; KHANUM, F.; KAUL, V.K. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Diabetes and Its Complications**, vol. 27, p. 103-113, 2013.

SHOAIB, M.; SHEHZAD, A.; OMAR, M.; RAKHA, A.; RAZA, H. SHARIF, H.R. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, vol. 14, p. 444-454, 2016.

SILVA, B.V.; BARREIRA, J.C.M.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery Technologies. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 50, p. 144-158, 2016.

SILVA, N.K.V.; SABINO, L.B.S.; OLIVEIRA, L.S.; TORRES, L.B.V.; SOUSA, P.H.M. Effect of food additives on the antioxidant properties and microbiological quality of red guava juice. **Revista Ciência Agronômica**, vol. 47, n. 1, p. 77-85, 2016.

SINGH, S.P.; PAL, R.K. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 47, p. 296-306, 2008.

SINGLETON, V., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu's reagent, **Methods Enzymology**, vol. 299, p. 152-178, 1999.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, vol. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Manutenção de microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, vol. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SPELBRINK, R.E.J.; LENSING, H.; EGMOND, M.R.; GIUSEPPIN, M.L.F. Potato patatin generates short-chain fatty acids from milk fat that contribute to flavour development in cheese ripening. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 176, p. 231-243, 2015.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy – Review article. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 36, p. 1-29, 1997.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Practices**. 3<sup>a</sup> edição. San Diego, 2004.

SWAIN, M.R.; ANANDHARAJ, M.; RAY, R.C.; RANI, R.P. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. **Biotechnology Research International**, vol. 2014, p.1-19, 2014.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBYB, K.; CISNEROS-ZEVALLOSC, L.; BYRNEC, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol.19, n. 6–7, p. 669-675, 2006.

THOMAS, J.E.; GLADE, M.J. Stevia: It's not just about calories. **The Open Obesity Journal**, vol. 2, p. 101-109, 2010.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 73, p 393-398, 2001.

TUOMOLA, E.M.; SALMINEN, S.J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cells cultures. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 41, n. 1, p. 45-51, 1998.

YÜCESAN, B. et al. In vitro and ex vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high Rebaudiose-A content-A commercial scale application. **Scientia Horticulturae**, vol. 203, p. 20-28, 2016.

ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D. et al. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, vol. 23, p. 61-67, 2014.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A – Formulário de aceitabilidade de intenção de compra

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

1- PROVE cada amostra do suco probiótico de goiaba e, utilizando a escala abaixo, indique o quanto ideal encontra-se a **DOÇURA** e **ACIDEZ** de cada amostra:

- +3 – muito + intenso do que o ideal
- +2 – moderadamente + intenso do que ideal
- +1 – ligeiramente + intenso do que ideal
- 0 – intensidade ideal
- 1 – ligeiramente – intenso do que o ideal
- 2 – moderadamente – intenso do que o ideal
- 3 – muito – intenso do que o ideal

AMOSTRA	DOÇURA	ACIDEZ
_____	_____	_____
_____	_____	_____

2- PROVE cada amostra e, utilizando a escala abaixo avalie o quanto você **gostou ou desgostou** de cada amostra de suco probiótico de goiaba **DE UM MODO GERAL**:

- 9- gostei extremamente (adorei)
- 8-
- 7- gostei moderadamente
- 6-
- 5- nem gostei/nem desgostei
- 4-
- 3- desgostei moderadamente
- 2-
- 1-desgostei extremamente (detestei)

AMOSTRA	VALOR
_____	_____
_____	_____

3- PROVE, da esquerda para direita, as duas amostras de suco probiótico de goiaba e faça um círculo na sua amostra de **preferência**:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

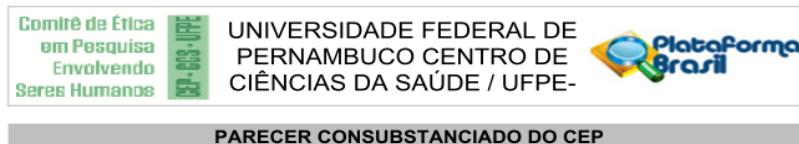
4- Se você encontrasse esses sucos probióticos de goiaba à venda, indique através da escala abaixo, o grau de certeza com que você **compraria ou não compraria** cada amostra:

- 9- certamente compraria
- 8-
- 7- possivelmente compraria
- 6-
- 5- talvez comprasse/talvez não comprasse
- 4-
- 3- possivelmente não compraria
- 2-
- 1-certamente não compraria

AMOSTRA	VALOR
_____	_____
_____	_____

**ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



### DADOS DO PARECER

**Número do parecer:** 1.735.991

#### APRESENTAÇÃO DO PROJETO:

Trata-se de ementa da pesquisa de mestrado de Nutrição do CCS/UFPE apresentada pela estudante RAÍSSA HOLANDA CAVALCANTI DE ANDRADE, orientado pela Prof.<sup>a</sup> Ester Ribeiro Gouveia, que solicita simples modificação na Hipótese, no Objetivo geral e específicos, no Material (Adição de polpa, estévia e inulina, Fermentação do suco e adição de estévia e inulina, Estudo de estoque dos sucos, Análise sensorial), Cronograma, Orçamento, Resultados esperados, Bibliografia e TCLE.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados em quantidade e dentro das normas do CEP/CCS/UFPE.

#### Recomendações:

Nenhuma

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

#### Considerações finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 20 de Setembro de 2016

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

### Termo de consentimento livre e esclarecido

Convido o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa que tem como título “PRODUÇÃO DE SUCO SIMBIÓTICO DE GOIABA (*Psidium guajava L.*): EFEITO DA INULINA NA SOBREVIVÊNCIA DO *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 NAS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Raíssa Holanda Cavalcanti de Andrade, Rua Velha, 90, apto 203 – Boa Vista – Recife – Pernambuco, Telefone: (81) 996883789, e-mail: [raissa\\_andrade@hotmail.com](mailto:raissa_andrade@hotmail.com). Está sob a orientação da Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia (Telefone: (81) 99900-0236, e-mail: [estergouveia@gmail.com](mailto:estergouveia@gmail.com)) e co-orientação da Prof. Dra. Patrícia Moreira Azoubel (Telefone: (81) 99268-8258 e-mail: [pazoubel@gmail.com](mailto:pazoubel@gmail.com)).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

#### Informações sobre a pesquisa:

- Esta pesquisa consiste na formulação de um suco de goiaba utilizando o probiótico (bactéria benéfica que auxilia nos problemas intestinais) *Lactobacillus rhamnosus* e o prebiótico (substância que ajuda nos problemas intestinais) inulina, com o objetivo de verificar se a quantidade de inulina adicionada influencia numa maior sobrevivência dessa bactéria no tempo de vida de prateleira (validade do produto).
- Para tornar a bebida mais nutritiva, na análise sensorial será adicionado um açúcar natural, a Stevia. Através dos dados da análise sensorial, poderá se ter uma noção se esses sucos terão uma aceitação do mercado consumidor.
- Os riscos desta etapa estão condicionados ao participante, se tiver alergia a algum dos componentes das amostras. Por este motivo, será perguntado a você se possui algum tipo de alergia aos componentes da amostra.
- Como benefícios da execução do projeto, espera-se produzir resultados que colaborem para o desenvolvimento de um suco que ajude nos problemas intestinais, podendo contribuir com a saúde do consumidor.
- O participante será submetido a participação da análise sensorial do suco simbiótico (produto que combina a inulina com a bactéria benéfica) de goiaba fermentado adoçado com Stevia (açúcar natural) próximo da validade do produto e do suco

simbótico de goiaba não-fermentado adoçado com Stevia (açúcar natural) próximo da validade do produto.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa através do questionário, ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária e a liberação será feita logo em seguida a análise sensorial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

---

(assinatura do pesquisador)

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, \_\_\_\_\_, RG/CPF: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Recife, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2016

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Testemunha 1: Nome: Assinatura:	Testemunha 2: Nome: Assinatura:
---------------------------------------	---------------------------------------