

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Antibióticos

Programa de Pós -Graduação em Biotecnologia Industrial

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESTOQUE DE BEBIDAS
PROBIÓTICAS, FERMENTADA E NÃO FERMENTADA, À BASE DA
POLPA E DA PECTINA DO MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora
cincinnata* Mast.)**

ORIENTADOR: Profª Dra. Ester Ribeiro Gouveia

MESTRANDA: Eloyza Karoline Rozendo dos Santos

Recife

2017

ELOYZA KAROLINE ROZENDO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESTOQUE DE BEBIDAS
PROBIÓTICAS, FERMENTADA E NÃO FERMENTADA, À BASE
DA POLPA E DA PECTINA DO MARACUJÁ DA CAATINGA
(*Passiflora cincinnata* Mast.)**

Dissertação apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ester Ribeiro Gouveia

**Recife
2017**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Santos, Eloisa Karoline Rozendo dos

Produção e avaliação do estoque de bebidas probióticas, fermentada e não fermentada, à base da polpa e da pectina do maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) / Eloisa Karoline Rozendo dos Santos. – Recife: O Autor, 2017.

82 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências

1. Maracujá 2. Probióticos 3. Bebidas não alcoólicas I. Gouveia, Ester Ribeiro (orient.) II. Título

641.34425

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-314

ELOYZA KAROLINE ROZENDO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESTOQUE DE BEBIDAS
PROBIÓTICAS, FERMENTADA E NÃO FERMENTADA, À BASE
DA POLPA E DA PECTINA DO MARACUJÁ DA CAATINGA
(*Passiflora cincinnata* Mast.)**

Dissertação apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Ester Ribeiro Gouveia
(UFPE)

Prof.^a Dra. Patrícia Moreira Azoubel
(UFPE)

Maria Carolina de Albuquerque Wanderley
(UFRPE)

Recife, 22 de Fevereiro de 2017.

Dedico esse trabalho a três amores:

A minha fortaleza, minha mãe Elvira Rozendo, ao
meu grande amigo Ailton Sena e ao meu amado Jonathan Araújo.

A vocês toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter me apoiado e me dado forças.

À minha família, meu auxílio e fortaleza.

Ao meu noivo amado que sempre foi tão prestativo e paciente.

À minha orientadora Profa. Dra. Ester Gouveia, por seus conselhos, dedicação e paciência.

À minha querida amiga e parceira fiel Raissa Andrade, que dividiu comigo as alegrias e dificuldades durante o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LABBIO) Mariana, Zilmar e Karen, pela amizade e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial por todo apoio.

Ao Departamento de Antibióticos (CCB) e ao Departamento de Nutrição (CCS), pela acessibilidade de seus equipamentos e pelo acolhimento por parte de seus técnicos.

À CAPES, Órgão Financiador do presente estudo.

Aos integrantes da banca avaliadora pela contribuição para este trabalho.

“Sem a convicção de uma harmonia íntima do Universo, não poderia haver ciência.”

Albert Einstein

RESUMO

A busca por alimentos probióticos não lácteos tem crescido nos últimos anos, sendo os sucos de frutas as bebidas mais utilizadas para este fim, devido aos seus atributos nutricionais. A polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) pode ser utilizado para esse fim. Além disso, sua casca pode ser empregada para extração de pectina, fibra solúvel cuja atuação pode beneficiar a saúde intestinal, devido a sua ação prebiótica. No entanto, a produção de bebidas probióticas enfrenta dois principais desafios, manutenção da viabilidade dos micro-organismos em estoque e garantia de sua sobrevivência após passagem pelo trato gastrointestinal. Sendo assim, visando melhorar esses parâmetros, tem-se utilizado estratégias, como a fermentação das bebidas e associações desses micro-organismos a prebióticos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi produzir e avaliar o estoque de bebidas probióticas, fermentadas e não fermentadas, a base da polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), contendo a pectina extraída da farinha da casca deste fruto e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Para isso, realizou-se a extração da pectina com ácido cítrico 0,75 M a partir da farinha da casca do Maracujá da Caatinga em incubadora rotativa (50 °C e 150 rpm). Em seguida, foram elaboradas 2 bebidas para o estudo de estoque, adicionadas com o *L. rhamnosus* ATCC 7469, fermentada (FCPext) e não fermentada (NFCPext) com a pectina extraída (20 g/L). Aspectos como ácidos orgânicos, carboidratos, viabilidade e sobrevivência gastrointestinal *in vitro* acompanhado durante o período de 28 dias para essas bebidas. O rendimento da pectina extraída a partir da casca do Maracujá da Caatinga foi de 55 %. O micro-organismo deteve redução de 26,30 % em sua viabilidade durante o início e o final do período estocagem para a bebida NFCPext, apresentando maior estabilidade em comparação com as demais bebidas. No entanto, a bebida FCPext deteve maior índice de sobrevivência para *L. rhamnosus* ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais (53,59 %) no último dia de estoque, além de conter concentração de 1,28 g/L de ácido lático. Dessa maneira a bebida FCPext apresentou maior potencial de consumo, visto a melhor resposta do microrganismo à simulação das condições gastrointestinais e a presença de ácido lático, agente antimicrobiano capaz de evitar a contaminação da bebida por outros micro-organismos.

Palavras-chave: Frutas. Produto fermentado. Vida de prateleira.

ABSTRACT

The search for non-dairy probiotic foods has grown in recent years, with fruit juices being the most widely used beverages for this purpose because of their nutritional attributes. The pulp of passion fruit from Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) can be used for this purpose. In addition, its peel may be employed for extraction of pectin, soluble fiber whose performance may benefit intestinal health, due to its prebiotic action. However, the production of probiotic beverages faces two main challenges, maintaining the viability of microorganisms in stock and guaranteeing their survival after passage through the gastrointestinal tract. Therefore, in order to improve these parameters, strategies have been used, such as the fermentation of beverages and associations of these microorganisms to prebiotics. The objective of this work was to produce and evaluate the stock of probiotic drinks, fermented and unfermented, the base pulp of passion fruit from Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) containing the extracted pectin from the peel of this fruit flour and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. For this, the extraction of pectin with 0.75 M citric acid was carried out from the cashew meal of the Passion fruit from Caatinga in a rotating incubator (50 ° C and 150 rpm). Subsequently, 2 stock drinks were added to *L. rhamnosus* ATCC 7469, fermented (FCPext) and unfermented (NFCPext) with the extracted pectin (20 g / L). Aspects such as organic acids, carbohydrates, viability and gastrointestinal survival in vitro were monitored during the 28 day period for these beverages. The yield of pectin extracted from the passion fruit peel of the Caatinga was 55%. The microorganism had a reduction of 26.30% in its viability during the beginning and the end of the storage period for the NFCPext beverage, presenting greater stability compared to the other beverages. However, the FCPext beverage had a higher survival rate for *L. rhamnosus* ATCC 7469 in the simulation of gastrointestinal conditions (53.59%) on the last day of storage, and contained a concentration of 1.28 g / L lactic acid. In this way the FCPext drink presented a greater potential of consumption, considering the best response of the microorganism to the simulation of the gastrointestinal conditions and the presence of lactic acid, an antimicrobial agent able to avoid the contamination of the drink by other microorganisms.

Keywords: Fruits. Fermented product. Shelf life.

LISTA DE FIGURA

Figura 3.1 - Representação da estrutura química de unidades de Ácido galacturônico (A); Ácido galacturônico esterificado (B); Estrutura química da pectina (C). Fonte: Bobbio e Bobbio, 1989.....	25
Figura 4.1 - Esquema ilustrativo do processo para preservação de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 em glicerol 10 % (v/v) à – 20°C.....	33
Figura 4.2 - Frutos do Maracujá da Caatinga (<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.).....	34
Figura 4.3 - Esquema ilustrativo para a determinação da viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469.....	40
Figura 4.4 - Ilustração esquemática do teste de simulação gastrointestinal para verificação da resistência de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.....	41
Figura 5.1 – Viabilidade Inicial e final (Log UFC/mL) de <i>L. rhamnosus</i> ATCC7469 para Teste Gastrointestinal para as bebidas probióticas não fermentadas (Sem pectina e sem sacarose (SPSS), Sem pectina e com sacarose (SPCS), Com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e Com Pectina extraída e com sacarose (CPextCS) e seus respectivos índices de sobrevivência (%). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre a viabilidade inicial e final do TGI para cada grupo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes grupos.....	49
Figura 5.2 – Viabilidade Inicial e final (Log UFC/mL) de <i>L. rhamnosus</i> ATCC7469 para Teste Gastrointestinal para as bebidas probióticas fermentadas (Sem pectina e sem sacarose (SPSS), Sem pectina e com sacarose (SPCS), Com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e Com Pectina extraída e com sacarose (CPextCS) e seus respectivos índices de sobrevivência (%). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre a viabilidade inicial e final do TGI para cada grupo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes grupos.....	51
Figura 5.3 - Viabilidade (Log UFC/mL) do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 no início e no final do período de estoque refrigerado (4 °C) para as quatro condições: (FCP) Fermentado com pectina comercial, (NFCP) Não fermentado com pectina comercial, (FCPext) Fermentado com pectina extraída e (NFCPext) Não fermentado com pectina extraída. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) para a viabilidade durante o tempo (inicial e final) no mesmo estoque; Diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) durante o tempo para os diferentes estoques.....	54
Figura 5.4 - Viabilidade inicial e final (Log UFC/mL) <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 para o Teste Gastrointestinal (TGI) no início do estoque (A) e no final do estoque (B) do período de cada condição (Fermentado com pectina comercial (FCP), Não fermentado com pectina comercial (NFCP), Fermentado com pectina extraída (FCPext) e Não fermentado com pectina extraída (NFCPext)) e seus respectivos índices de sobrevivência (%). Diferentes letras minúsculas	

demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre a viabilidade inicial e final do TGI para cada grupo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes grupos.....55

Figura 5.5 – Perfil do pH em cada bebida (Fermentado com pectina comercial (FCP), Não fermentado com pectina comercial (NFCP), Fermentado com pectina extraída (FCPext) e Não fermentado com pectina extraída (NFCPext) e concentração de ácido láctico correspondente ao período final de estoque. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre o pH inicial e final para cada condição; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre as diferentes condições.....57

Figura 5.6 - Concentrações iniciais e finais de sacarose (g/L) e seu respectivo consumo por *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o período de estoque refrigerado (4 °C) para as quatro condições: (FCP) Fermentado com pectina comercial, (NFCP) Não fermentado com pectina comercial, (FCPext) Fermentado com pectina extraída e (NFCPext) Não fermentado com pectina extraída. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) para a sacarose durante o tempo (inicial e final) na mesma condição; Diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) durante o tempo para as diferentes condições.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição química e funções de cada componente do MRS (de Man, Rogosa, Sharpe), meio de cultura formulado e descrito por J. C. De MAN; M. ROGOSA, M.; ELISABETH SHARPE em 1960.....30

Tabela 5.1 - Caracterização físico-química da polpa *in natura* do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) e sua comparação com estudos realizados por Araújo et al., 2009, Pita, 2012 e Farias, 2016.....44

Tabela 5.2 - Comparação da composição físico-química da polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) antes (PNP) e após a pasteurização (PP).....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANOVA - Análise de Variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC - American Type Culture Collection
CETENE - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CLAE - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CPCS - Com Pectina Comercial e Com Sacarose
CPextCS - Com Pectina Extraída e Com Sacarose
DCNTs - Doenças Crônicas não Transmissíveis
DE - Grau de Esterificação
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FCP - Fermentado com Pectina
FCPext - Fermentado com Pectina Extraída
GalA - Ácido Galacturônico
LAB - Bactérias Lácticas
MRS - de Man, Rogosa, Sharpe
NFCP - Não Fermentado com Pectina
NFCPext - Não Fermentado com Pectina Extraída
OMS - Organização Mundial de Saúde
PNP - Polpa não Pasteurizada
PP - Polpa Pasteurizada
SPCS - Sem Pectina e Com Sacarose
SPSS - Sem pectina e Sem Sacarose
UFC - Unidades formadoras de colônias
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
UV - Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Aspectos Gerais do Maracujá da Caatinga	19
3.2. Alimentos Funcionais	21
3.3. Pectina	24
3.3.1. Composição e Estrutura	24
3.3.2. Extração	26
3.3.3. Aplicações Industriais e Efeitos Prebióticos	27
3.4. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> : Classificação e Aplicação	28
3.5. Considerações para Aplicação de Matrizes não Lácteas no Desenvolvimento de Produtos Probióticos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Micro-organismo: Preservação e Reativação	32
4.2. Maracujá da Caatinga	33
4.2.1. Polpa do Maracujá da Caatinga	34
4.2.2. Farinha da Casca do Maracujá da Caatinga	34
4.2.3. Extração da pectina	35
4.3. Formulações das Bebidas Probióticas	35
4.3.1. Meio de Cultura à Base da Polpa do Maracujá da Caatinga	35
4.3.2. Produção das Bebidas Não Fermentadas	36
4.3.3. Produção das Bebidas Fermentadas	36
4.4. Fermentações em Meios Contendo Pectina: Avaliação do Consumo de Pectina por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	37
4.5. Métodos Analíticos	37
4.5.1. Determinação da Umidade	37
4.5.2. Determinação do Grau de Esterificação	37
4.5.3. Análises em Polpa do Maracujá da Caatinga	39
4.5.4. Determinação do pH	39
4.5.5. Determinação da Viabilidade	39

4.5.6. Resistência de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 às Condições de Simulação Gastrointestinal.....	40
4.5.7. Determinação de Carboidratos e de Ácidos Orgânicos	42
4.6. Análises Estatísticas.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Maracujá da Caatinga: Polpa e Casca.....	44
5.1.1. Avaliação da Influência da Pasteurização da Polpa	46
5.1.2. Farinha da Casca: Rendimento Gravimétrico e Grau de Esterificação da Pectina	48
5.2. Fermentações em Meios Contendo Pectina	49
5.3. Influência da Pectina e da Sacarose na Sobrevivência do Microrganismo nas Condições Gastrointestinais Simuladas	50
5.4. Avaliação do Estoque Refrigerado das Bebidas Funcionais Contendo <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 e Pectina	53
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas a conscientização da inter-relação entre alimentação, saúde e qualidade de vida tem impulsionado a busca por alimentos funcionais. Dentre os alimentos que vem se destacando nesse setor, estão os que apresentam micro-organismos probióticos, os quais são incorporados majoritariamente em produtos à base de leite (BEVILACQUA *et al.*, 2013). Esse fator pode limitar o consumo, já que cerca de 40 % da população brasileira apresenta algum nível de intolerância a produtos lácteos, cujo consumo pode trazer reações como náuseas, diarreia, excesso de gases e dor de estômago (EBC, 2013). Dessa forma é necessário o desenvolvimento de alimentos não lácteos para esse fim, visando atender uma gama maior da população.

A utilização de bebidas à base de frutas é uma das alternativas para driblar essa realidade. São nutricionalmente ricas, pois possuem carboidratos, minerais, vitaminas, fibras e antioxidantes, além de serem regularmente consumidas por grande parte da população (RAKIN *et al.*, 2007; RIVERA-ESPINOZA & GALLARDONAVARRO, 2010). O maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), planta silvestre do semiárido nordestino, inclui-se dentre os frutos que podem ser utilizados para este fim, devido aos compostos bioativos que possui e por já ter aplicabilidade conhecida em diferentes regiões do país, como por exemplo, sua utilização na produção de bebida probiótica (FARIAS *et al.*, 2016). Além da polpa, a casca desse fruto também pode ser aproveitada na extração da pectina, fibra solúvel cuja atuação pode beneficiar a saúde intestinal, devido a sua ação prebiótica (PITA, 2012; CANTERI, 2012; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016).

Tradicionalmente, a produção de bebidas probióticas apresenta dois principais desafios, a manutenção da viabilidade dos micro-organismos no período de estoque e a garantia de sua sobrevivência e atividade metabólica após sua passagem pelas condições do sistema digestório, como pH ácido do estômago e o contato com a bile no intestino. Dentre as espécies probióticas utilizadas para a elaboração desses produtos está *Lactobacillus rhamnosus*, principalmente por ser identificada com capacidade de adesão à camada epitelial do intestino (DORON *et al.*, 2005). No entanto, mesmo já sendo aplicado no desenvolvimento de alimentos probióticos, é válido ressaltar a necessidade

de investigação a cerca de diferentes linhagens desse micro-organismo, principalmente pelo alto interesse biotecnológico que possuem. *L. rhamnosus* ATCC 7469 pode ser considerado um bom exemplo de linhagem probiótica que merece ter sua investigação ampliada, por apresentar potencial para a geração de produtos funcionais.

Independente da espécie de probiótico utilizada tem-se buscado aumentar os índices de sobrevivência desses, tanto em estoque quanto após a passagem pelo trato digestório. Para isso, são utilizadas estratégias como desenvolvimento de produtos fermentados e associação com prebióticos, como por exemplo, pectina. A fermentação de alimentos, além de garantir um maior tempo de preservação do produto, promove a geração, por micro-organismos, de compostos que previnem contaminação durante o período de estoque, como por exemplo, o ácido láctico, que possui característica antimicrobiana (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; DALIRI; LEE, 2015). Por outro lado, a associação entre prebióticos e probióticos pode influenciar a resistência do micro-organismo as condições de estresse do sistema digestório, o que irá depender da linhagem e do prebiótico utilizados (NAZARRO *et al.*, 2012).

Segundo Parkar *et al.* (2010), a sobrevivência para *Lactobacillus rhamnosus* nas condições gastrointestinais simulada pode ser influenciada negativamente pelo aumento da concentração de pectina cítrica em seu cultivo. No entanto, a ausência de informações específicas para linhagem de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 demonstra a relevância de se avaliar seu comportamento em condições de estresse inerente ao sistema gastrointestinal e sua interação com diferentes tipos de pectinas. Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a produção e o estoque de bebidas probióticas, fermentadas e não fermentadas, à base da polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), contendo a pectina extraída da farinha da casca deste fruto e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir e avaliar o estoque de bebidas probióticas, fermentada e não fermentada, à base da polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), contendo a pectina extraída da farinha da casca deste fruto e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair a pectina da farinha da casca do Maracujá da Caatinga (*P. cincinnata* Mast.);
- Determinar o rendimento gravimétrico da extração da pectina e o grau de esterificação;
- Avaliar a fermentação de meios contendo pectina quanto à produção de ácidos graxos de cadeia curta;
- Verificar a influência da adição de pectina nas bebidas probióticas, sobre a viabilidade do micro-organismo;
- Verificar a influência da adição de sacarose nas bebidas probióticas, sobre a viabilidade;
- Comparar os efeitos da fermentação na elaboração das bebidas probióticas;
- Verificar a concentração do ácido láctico e o pH nas bebidas probióticas;
- Verificar o consumo da sacarose após o período do estoque, nas bebidas probióticas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos Gerais do Maracujá da Caatinga

O maracujá pertence à família botânica Passifloraceae, composta por mais de 500 espécies distribuídas em 18 gêneros, dentre os quais se destaca *Passiflora*, pelo número de espécies que possui e por sua relevância econômica (PEREIRA; CORRÊA; OLIVEIRA, 2015). O Brasil, assim como a Colômbia, Equador e Peru, são considerados um dos principais centros de diversidade para o gênero, por apresentar cerca de 120 espécies em seu território (FALEIRO *et al.*, 2011; PEREIRA; CORRÊA; OLIVEIRA, 2015). Sendo assim, nos últimos anos o país tem tido papel de destaque como o maior produtor mundial de maracujá, totalizando cerca de 60 % da produção global (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Essa posição, de acordo com Castro *et al.* (2012), é, principalmente consequência do investimento em pesquisa para o desenvolvimento de variedades e híbridos geneticamente mais adaptados, juntamente com a melhoria do sistema produtivo.

Apesar da grande biodiversidade nativa de espécies de *Passifloraceae*, o Maracujá Amarelo ou Azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) domina cerca 95 % dos palmares de *Passiflora* existentes no Brasil, devido à suas características alimentares, ornamentais, medicinais, qualidade dos seus frutos, produtividade e rendimento em suco (MELETTI & BRUCKNER, 2001; PITA, 2012; CERQUEIRA-SILVA *et al.*, 2014). No entanto, em uma escala menor, outras espécies também são cultivadas devido ao seu sabor, propriedades medicinais ou ornamentais, como por exemplo, *Passiflora cincinnata* Mast. (BERNACCI *et al.*, 2008).

A espécie *Passiflora cincinnata* Mast. é caracterizada como uma planta silvestre popularmente conhecida como Maracujá do Mato, Maracujá Mochila, Maracujá Tubarão ou Maracujá da Caatinga (BERNACCI; VITTA; BAKKER, 2003; EMBRAPA, 2016). É considerada uma fruta tropical e apresenta ampla distribuição na América do Sul, do leste do Brasil até o oeste da Bolívia, tendo ocorrência preferencial em áreas abertas e ambientes degradados, sendo comumente encontrada em bordas de matas e campos cultivados (KILLIP, 1938; CERVI, 1997; NUNES & QUEIROZ, 2001). No Brasil, apresenta ocorrência espontânea na região do semiárido nordestino (ARAÚJO *et al.*, 2008), havendo registro de sua distribuição nos estados do Pará, Piauí,

Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (LIMA & CUNHA, 2004).

Trabalhos demonstram que essa espécie pode ser utilizada para diversos fins, tais como: 1) Fonte de frutos para consumo *in natura* ou desenvolvimento de produtos processados; 2) Porta enxerto no desenvolvimento de híbridos interespecíficos com potencial agrônomico; 3) Planta ornamental devido a sua beleza; 4) planta medicinal, por apresentar compostos químicos destinados à indústria farmacêutica; e 5) Em programas de melhoramento genético por apresentar resistência a doenças e pragas, longevidade, período de florescimento ampliado, natureza perene e resistência à seca (ARAÚJO *et al.*, 2006; ARAÚJO; SILVA; QUEIROZ, 2008; KIILL *et al.*, 2010; CASTRO, 2012; AMORIM *et al.*, 2013).

O Maracujá da Caatinga é comercializado no Nordeste na entressafra do Maracujá Amarelo, apresentando assim uma excelente opção de renda para os pequenos agricultores, uma vez que se trata de uma espécie adaptada às condições locais de cultivo, por ser nativa da região (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2010). Além do seu consumo *in natura*, o fruto do Maracujá da Caatinga é utilizado para o desenvolvimento de produtos derivados. No estado da Bahia, geleia a base de polpa do Maracujá da Caatinga é consumida na merenda escolar dos municípios de Uauá, Curaçá e Canudos no estado da Bahia e exportado para Alemanha e Itália (ARAÚJO *et al.*, 2006; ARAÚJO, 2007). Por sua vez, na região do Araripe, a polpa é utilizada para dar sabor ao iogurte, demonstrando assim que apresenta potencial de mercado e que sua utilização tem capacidade de melhorar o desenvolvimento econômico e social regional (SOUZA *et al.*, 2013).

Além destas aplicações, Amorim *et al.* (2013) demonstraram que a polpa do Maracujá da Caatinga pode ser utilizada para a produção artesanal de licores, constituindo-se, assim, de uma alternativa interessante para aumentar a renda familiar, pois, além de ser um processo que exige tecnologia simples, o produto final pode ser comercializado em temperatura ambiente e apresenta extensa vida-de-prateleira. Dessa forma, é possível perceber que a polpa do Maracujá da Caatinga apresenta grande potencial de mercado por se tratar de um fruto de aroma bastante característico e sabor exótico, características apreciadas pela maioria dos seus consumidores (SOUZA *et al.*, 2013). A partir desse contexto, em 2016 a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) lançou, após uma década de estudos, a primeira variedade para cultivo comercial denominada de BRS Sertão Forte (EMBRAPA, 2016).

No entanto, apesar da aplicabilidade já explorada da polpa do Maracujá da Caatinga, sua casca ainda é uma biomassa subutilizada e trabalhos acerca da mesma são escassos. Segundo Mirabella et al. (2014), frutas tropicais são conhecidas por serem ricas em compostos bioativos, como por exemplo, compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas e fibras, os quais podem ser encontrados em seus subprodutos (cascas, sobra de polpa e sementes), às vezes até em maiores quantidades do que nas partes comestíveis.

A casca de diferentes espécies de maracujá (*Passiflora* sp.) vem recebendo ascendente atenção na pesquisa por apresentar em sua composição baixo valor calórico e elevados níveis de potássio. Além disso, quando em farinha, a casca desse fruto pode apresentar em sua composição 60 – 80 % de pectina (CORRÊA et al., 2016). Nos últimos anos, a exploração da casca de diferentes maracujás, como *Passiflora edulis* f. flavicarpa e *Passiflora cincinnata* Mast., para a obtenção de pectina tem sido proposta por diversos autores (PINHEIRO et al., 2008, KULKARNI & VIJAYANAND, 2010, LIEW, CHIN & YUSOF, 2014, SEIXAS et al., 2014, SANTOS; AZOUBEL & GOUVEIA, 2016), podendo assim se tornar uma alternativa às fontes comerciais de pectina normalmente utilizadas, como casca de frutas cítricas e bagaço de maçã (CORRÊA et al., 2016). Isso demonstra a relevância dessa matéria-prima e seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, promovendo o enriquecimento desses, principalmente com relação aos teores de fibras que apresentam, podendo assim ser utilizada para a extração de pectina por apresentar elevados teores da mesma (BUCKERIDGE & TINÉ, 2001).

Dessa forma, é válido salientar que, em decorrência da escassez de estudos acerca da utilização para casca do Maracujá da Caatinga e de seus subprodutos, se faz relevante à busca da aplicabilidade e exploração dos mesmos, por trazer em si a capacidade de aplicação desses como ingredientes tecnológicos na indústria alimentar e de valor nutricional agregado.

3.2. Alimentos Funcionais

O cenário epidemiológico brasileiro retrata o aumento no número de casos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) como obesidade, hipertensão arterial sistêmica, osteoporose, diabetes *mellitus* e câncer, sendo estimado que essas doenças

respondam por cerca de 70 % das mortes no Brasil, atingindo fortemente camadas pobres da população e grupos vulneráveis (BRASIL, 2011, SILVA *et al.*, 2016). Devido a esse cenário, o Brasil tem buscado programar Políticas Nacionais de Promoção a Saúde que visem reduzir o risco a DCNTs, como a priorização da alimentação saudável, atividade física e prevenção ao uso do tabaco e álcool (BRASIL, 2011). Com relação à alimentação, ao longo das últimas décadas, o interesse das pessoas em saúde e qualidade de vida tem impulsionando a procura por produtos naturais e ingredientes alimentares com características funcionais, principalmente, por ser considerada uma estratégia para conter o avanço das DCNTs (GOMÉZ *et al.*, 2016, ROBERFROID, 2002).

Um alimento para ser considerado funcional, além de satisfazer as necessidades nutricionais básicas do indivíduo, deve afetar positivamente uma ou mais funções fisiológicas do organismo, favorecendo a saúde, melhorando a qualidade de vida e auxiliando na redução de riscos de doenças (IGLESIAS, 2010, SILVA *et al.*, 2016). Além desses atributos, os alimentos funcionais devem demonstrar seus efeitos em quantidades que normalmente podem ser consumidos na dieta, não sendo consideradas uma pílula ou cápsula, mas parte do padrão alimentar normal (ROBERFROID, 2002).

A expressão “alimento funcional” teve origem no Japão em meados da década de 80, também denominados alimentos para uso específico da saúde (FOSHU, do inglês *Foods for Specified Health Use*) (SILVA *et al.*, 2016). Esse termo foi criado com o propósito de denominar alimentos processados, que pudessem ser consumidos livremente, e que, além de nutritivos, contivessem em sua composição um ou mais ingredientes capazes de auxiliar funções fisiológicas e corporais específicas, para a redução ao risco de doenças crônicas (BINNS & HOWLETT, 2009, STRINGUETA *et al.*, 2012). Apesar de não existir uma definição internacionalmente aceita para o termo “alimentos funcionais”, a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) os definiu como alimentos que se destinam a serem consumidos como parte da dieta normal e que contêm componentes biologicamente ativos com potencial de melhorar a saúde e reduzir o risco de doenças (FAO, 2007). No Brasil, a definição sustentada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é de que os alimentos com alegação de propriedade funcional são aqueles capazes produzir efeitos

metabólicos e ou fisiológicos e ou benéficos à saúde, além de funções nutricionais básicas, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (ANVISA, 2008).

Os alimentos funcionais podem ser considerados uma tendência de mercado e o sucesso desse seguimento está relacionado ao aumento do poder aquisitivo da Classe C e à maior consciência da população em relação aos benefícios para a saúde que esses alimentos podem trazer (GRAMKOW, 2014). Sua demanda tem crescido no Brasil, assim como vem ocorrendo em todo o mundo e, embora sendo considerado um mercado jovem, o país exemplifica o crescimento deste nicho, com resultados surpreendentes para o pouco tempo de criação do setor (FAO, 2007).

Existem diversas categorias de alimentos funcionais conhecidas atualmente, os quais podem ser classificados como compostos antioxidantes; redutores de riscos cardiovasculares; reguladores da fisiologia do trato gastrointestinal e moduladores de funções comportamentais e psicológicas (BARCELLOS, 2009). Dentre os ingredientes funcionais mais estudados atualmente estão os prebióticos e os probióticos, especialmente por seus atributos de promoção à saúde e prevenção de doenças.

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, porém fermentáveis pela microbiota intestinal (DUNCAN & FLINT, 2013). Para que um ingrediente seja considerado prebiótico ele deve resistir à acidez gástrica, a hidrólise por enzimas de mamíferos e a absorção gastrointestinal, sendo assim, fermentado pela flora do intestino grosso, tendo a capacidade de estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais associados aos efeitos de promoção à saúde (MACFARLANE, MACFARLANE & CUMMINGS, 2006; ROBERFROID, 2007). Dentre os prebióticos investigados nos últimos tempos encontram-se as pectinas, cujos efeitos estão relacionados à capacidade de serem convertidas em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), bem como em dióxido de carbono, pela ação de bactérias produtoras de enzimas pectinolíticas, como as dos gêneros *Aerobacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcuse*, *Enterococcus* (CANTERI, 2012).

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do seu hospedeiro, tendo assim a capacidade de modular a microbiota intestinal, neutralizar possíveis disfunções e antagonizar patógenos existentes (FAO/OMS, 2006; CEAPA *et al.*, 2013; AMARA & SHIBL, 2015; CRUCHET *et al.*, 2015). Além disso, esses micro-organismos trazem vários outros benefícios à saúde, tais como a diminuição da colonização de agentes patogênicos, otimização do trânsito intestinal, alívio da intolerância à lactose, redução

de inchaço e promoção de efeitos imunomoduladores (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). No entanto, para que um micro-organismo seja considerado probiótico, ele deve tolerar as condições do sistema gastrointestinal, como a presença de ácidos, bile, enzimas e níveis baixos de oxigênio (KOS *et al.*, 2000). Além disso, deve ser capaz de se aderir à mucosa gastrointestinal, promovendo sua colonização, evitando ser eliminado pelos movimentos peristálticos e pela exclusão competitiva com patógenos, devido à diminuição do pH, decorrente dos ácidos orgânicos produzidos, especialmente ácidos láctico e acético (KOS *et al.*, 2000; COLLADO; SHAH, 2007; MERILUOTO & SALMINEN, 2008).

No entanto, a produção industrial de probióticos ainda enfrenta desafios e a busca por melhores índices de sobrevivência para esses micro-organismos tem apresentado destaque no setor, sendo investigadas técnicas que busquem melhorar seus índices de sobrevivência durante o armazenamento e nas situações adversas do sistema digestório. Dentre essas técnicas está a associação de linhagens probióticas a prebióticos específicos, como por exemplo, inulina e pectina, os quais têm sido demonstrados capazes de modular respostas, como níveis de sobrevivência e adesão intestinal, de diferentes linhagens probióticas após passarem pelas condições de estresse gastrointestinal (PARKAR *et al.*, 2010; NAZZARO *et al.*, 2012). Dessa forma, verifica-se a importância de investigar as interações prebiótico-probiótico a fim de ampliar a ação de ambos no ambiente intestinal.

3.3. Pectina

3.3.1. Composição e Estrutura

A pectina, provavelmente a mais complexa macromolécula natural, é um polímero, do grupo das fibras dietéticas, amplamente utilizado como gelificante e estabilizante na indústria de alimentos (CANTERI *et al.*, 2012). Quimicamente, é definida como uma cadeia linear de heteropolissacarídeos, cuja estrutura possui uma cadeia principal com cerca de 150 a 500 unidades repetidas de ácido galacturônico (GalA) parcialmente esterificados com grupos metílicos, unidos por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 3.1) (COELHO, 2008). Além dos monômeros de GalA, a

pectina também é constituída por açúcares neutros, como galactose, glicose, ramnose, arabinose e xilose (BELUOMINI, 2013).

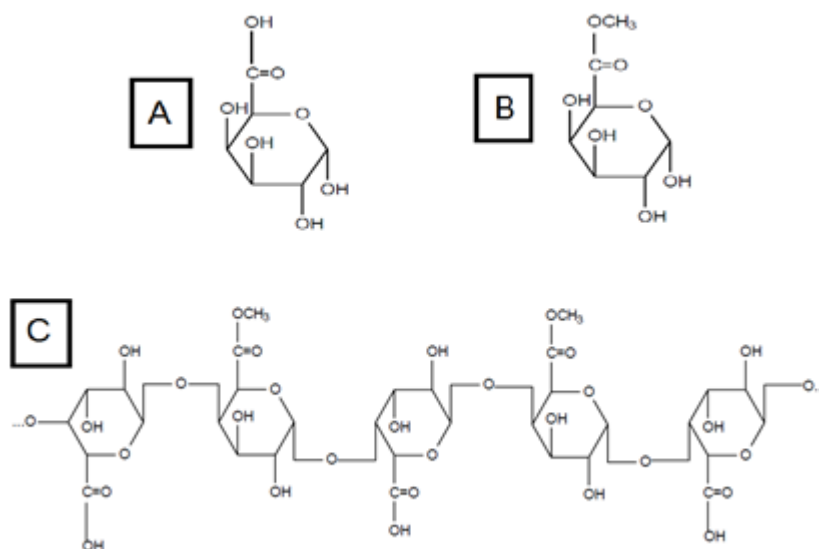


Figura 3.1 - Representação da estrutura química de unidades de Ácido galacturônico (A); Ácido galacturônico esterificado (B); Estrutura química da pectina (C). Fonte: Bobbio e Bobbio, 1989.

Existe uma variedade de tipos de pectina e este fator está intimamente associado à diversidade que sua estrutura química pode apresentar de acordo com sua matriz de origem. De modo geral, as pectinas podem ser constituídas por 17 monossacarídeos, que podem formar diferentes polissacarídeos, a partir de mais de 20 ligações distintas (VORAGEN, 2009). O meio mais utilizado para classificação das substâncias pécticas consiste na determinação do seu grau de esterificação (DE), o qual reflete o nível de carboxilas esterificadas presentes em sua estrutura. Esse aspecto pode ser considerado um dos mais importantes na estrutura de uma pectina, devido à sua excelente correlação com a propriedade de formação do gel, o qual define sua adequação no uso na indústria (FERTONANI, 2005).

Dependendo do DE, as pectinas podem ser classificadas comercialmente em dois grupos, pectina com alto grau de esterificação para $DE > 50\%$, e pectinas com baixo grau de esterificação, quando $DE < 50\%$ (THAKUR *et al.*, 1997). Dependendo do DE encontrado, a pectina exigirá condições distintas para atuar com gelificante. Sendo assim, pectinas com $DE > 50\%$ necessitam da presença de açúcar e pH ácido (2,0 – 3,5) para formação do gel. Por sua vez, pectinas com $DE < 50\%$ carecem da

presença de íons de cálcio, são independentes da presença de açúcares e podem atuar em uma maior faixa de pH (2,0 – 7,0) e (YAPO, 2009).

Tradicionalmente, a indústria de alimentos utiliza pectinas de alto grau de esterificação, as quais são extraídas a partir da polpa de maçã e de cascas de frutas cítricas. No entanto, em seu recente trabalho, Fissore et al. (2015) demonstrou que o baixo grau de esterificação da pectina pode estimular seletivamente o crescimento de linhagens probióticas, demonstrando assim que fontes vegetais capazes de disponibilizar pectinas de baixo grau de esterificação, como por exemplo, casca de maracujá, alcachofra e polpa de beterraba (FOOD INGREDIENTS BRASIL a, 2014; FISSORE *et al.*, 2015; SANTOS, AZOUBEL & GOUVEIA 2016), também apresentam potencial no mercado alimentício, em especial para o desenvolvimento de produtos funcionais.

3.3.2. Extração

As pectinas são convencionalmente extraídas na indústria com ácidos minerais fortes diluídos em água, sendo normalmente utilizados os ácidos nítrico, clorídrico e sulfúrico (MINJARES-FUENTES *et al.*, 2014). A elevada toxicidade desses compostos e a geração de efluentes corrosivos e de resíduos tóxicos pelos mesmos são as principais desvantagens da sua utilização (CALLIARI, 2004; SANTOS, 2015). Segundo Pinheiro (2007), a extração com ácidos minerais fortes pode apresentar inúmeras desvantagens, como poluição ambiental, corrosão e degradação da pectina extraída. Dessa forma, para tornar a pectina apta ao consumo, são necessários tratamentos específicos capazes de remover elementos tóxicos dos extratos pectínicos produzidos (YAPO, 2009).

A extração da pectina consiste em um processo de múltiplas etapas onde ocorre a hidrólise e a extração dessa macromolécula, a partir de tecidos vegetais, o qual pode ser influenciado por diversos fatores, principalmente temperatura, pH e tempo de extração (PAGÁN *et al.*, 2001). Na indústria, mesmo que haja variação das condições e tipo de ácido utilizados, tem-se pH na faixa de 1,5 a 3,0, temperaturas que variam de 60 a 100 °C e tempo de extração entre 0,5 a 6,0 horas (SAKAI *et al.*, 1993) demonstrando assim ser um processo energeticamente custoso .

Estudos têm buscado reduzir o tempo e energia empregada no processo de extração, assim como a substituição pelos ácidos minerais pela utilização de ácidos orgânicos, visto que esses últimos são menos agressivos devido a seu caráter natural, ou

seja, produzido pela atividade sintética de plantas e animais. Dentre os ácidos orgânicos mais estudados para extração de pectina está o ácido cítrico, considerado um bom agente extrator para diferentes matrizes vegetais, como bagaço de maçã, bagaço de uva e maracujá (VIRK & SOGI, 2004; CANTERI-SCHEMIN *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2008; KLIEMANN *et al.*, 2009; MINJARES-FUENTES, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

Além de sua eficácia para extração da pectina, o ácido cítrico é o ácido mais utilizado pela indústria alimentícia e de bebidas, uma vez que apresenta propriedades antioxidantes, acidulantes, flavorizantes, reguladoras de acidez. Ou seja, de modo geral preserva o sabor de bebidas e alimentos industrializados, regula o pH, mascara o sabor desagradável de alguns compostos, neutralizando o paladar doce e acidificando o sabor (FOOD INGREDIENTS BRASIL b, 2014). Dessa forma, quando a pectina passa a ser extraída quimicamente pela ação do ácido cítrico não são necessários tratamentos específicos para a remoção de elementos tóxicos dos extratos pécticos produzidos, REDUZIDO o processo, com segurança alimentar e diminuição da geração de resíduos tóxicos.

3.3.3. Aplicações Industriais e Efeitos Prebióticos

As pectinas podem atuar de diversas formas na indústria alimentícia e dentre suas aplicações mais conhecidas está sua atuação como agente estabilizante, espessante, gelificante e fibra solúvel (SRIRANGARAJAN & SHRIKHADE, 1976; NAMBUDIRI & SHIVASHANKAR, 1985; HIGAREDA *et al.*, 1995; WIDMER & MONTANARI, 1995). A influência que exerce sobre a textura dos alimentos favorece a aplicação dessa macromolécula natural para a geração de diversos produtos, como geleias, polpa de fruta, produtos cárneos, produtos de panificação, produtos lácteos, bebidas, compotas, doces e confeitados (SANTOS, 2015). Além da aplicação no setor alimentício, as pectinas são empregadas na geração de produtos farmacêuticos e cosméticos (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; PINHEIRO, 2007).

Todavia, as substâncias pécticas também possuem relevância quanto à manutenção da saúde humana. Nos últimos anos estudos têm demonstrado que as pectinas podem beneficiar a saúde intestinal devido a sua ação prebiótica, podendo assim ser fermentadas e convertidas em ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico,

também conhecidos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), bem como em dióxido de carbono, pela ação de bactérias produtoras de enzimas pectinolíticas (CANTERI, 2012). Sendo assim, as substâncias pécticas apresentam, através da sua metabolização, fraca tendência laxativa e estimulam seletivamente o crescimento de bactérias intestinais associadas à saúde, em especial pela atuação do ácido butírico, já que este influencia positivamente a saúde da mucosa do cólon pela inibição de inflamações e de carcinogênese, e pela prevenção de invasão por agentes enteropatogênicos (FLINT *et al.*, 2007; HAMER *et al.*, 2008; VAN DEUN *et al.*, 2008; MATTES, 2009; PARKAR *et al.*, 2010, DONGOWSKI *et al.*, 2002, FISSORE, 2015).

Outro aspecto importante consiste na capacidade das pectinas exercerem influência sobre linhagens probióticas. Parkar *et al.* (2010) demonstraram que a adesão celular para o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* foi influenciada positivamente pela atuação da pectina extraída do kiwi, a qual também atuou na queda da adesão para *Salmonella typhimurium* e Caco-2. Por sua vez, Nazzaro *et al.* (2012) demonstraram que a pectina induziu resistência as células de *Lactobacillus acidophilus* ao stress provocado pelo suco gastrointestinal, devido a alterações no perfil proteico celular e pela produção de butirato de sódio, sal derivado do ácido butírico (TONEL, 2009), composto capaz de atuar na regeneração da mucosa intestinal e regular a diferenciação celular, protegendo o intestino contra câncer (CAMPOS, 1999). Adicionalmente, estudos comprovam que as substâncias pécticas apresentam capacidade de atuar na redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e dos níveis de colesterol total, retardar o esvaziamento gástrico e melhorar a tolerância à glicose (DERIVI *et al.*, 2002; MIRA; GRAF; CÂNDIDO, 2009; GROND *et al.*, 2016).

3.4. *Lactobacillus rhamnosus*: Classificação e Aplicação

Atualmente, há um grande número de linhagens probióticas que possuem aplicações direcionadas especificamente ao sistema gastrointestinal. Dentre essas, as mais frequentemente utilizadas como suplementos probióticos são as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SANDERS & VELD, 1999; BLANDINO *et al.*, 2003; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003; SAAD, 2006). A espécie *Lactobacillus rhamnosus* tem sido estudada nos últimos anos, principalmente em virtude do seu potencial de promoção a saúde. Segundo a Agência de Vigilância

Sanitária (2008), *L. rhamnosus*, denominada como *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, está incluída dentro da categoria de micro-organismo probiótico, assim como *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum* e *E. faecium*. Tal fato estar relacionado principalmente sua resistência ao ácido biliar e capacidade de adesão à camada epitelial do intestino (DORON *et al.*, 2005).

Assim como os demais integrantes do gênero *Lactobacillus*, *L. rhamnosus* é uma bactéria Gram-positiva, com morfologia bacilar, classificada como anaeróbia aerotolerante e está incluída dentro do grupo das bactérias lácteas (LAB) (BERNARDEU *et al.*, 2008; MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP, 2010). Metabolicamente é classificada como um micro-organismo heterofermentativo facultativo, ou seja, é capaz de originar, além do ácido lático, outros produtos na fermentação com, ácido acético, etanol e CO₂ (RAPPOSCH; ELISKASES-LECHNER; GINZINGER, 1999, COSTA, 2006, BURITI; SAAD, 2007; MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP, 2010). Devido a suas exigências nutricionais, o que é inerente do próprio gênero, o cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* é realizado em meio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe), o qual supre suas necessidades metabólicas (Tabela 3.1), a uma temperatura ótima de 37 °C (MAN, ROGOSA, SHARPE 1960; CHANG & LIEW, 2013).

Lactobacillus rhamnosus foi isolado pela primeira vez do queijo parmesão, e atualmente sabe-se que o mesmo apresenta a capacidade de colonizar diversos habitats, incluindo materiais lácteos e sucos de fruta, bem como o trato gastrointestinal humano e de outros mamíferos (SUCCI *et al.*, 2005; CEAPA *et al.*, 2016; FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016). Em se tratando de sua propriedade de promoção a saúde, estudos demonstram que *L. rhamnosus* pode ser utilizado no tratamento de gastroenterite pediátrica (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). Além disso, possui atividade protetora contra infecções promovidas por *Escherichia coli* e na prevenção de infecções, tanto do trato respiratório quanto do trato gastrointestinal (SAITO; WATANABE; TADO, 1980; HOJSÁK *et al.*, 2010).

Tabela 3.1 - Composição química e funções de cada componente do MRS (de Man, Rogosa, Sharpe), meio de cultura formulado e descrito por J. C. De MAN; M. ROGOSA, M.; ELISABETH SHARPE em 1960.

Composto	Fórmula Molecular	Quantidade	Função
Extrato de Carne	-	10 g/L	
Extrato de Levedura	-	5 g/L	Fonte de carbono, nitrogênio e vitaminas
Peptona	-	20 g/L	
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	20 g/L	Carboidrato a ser fermentado
Acetato de Sódio	C ₂ H ₃ NaO ₂	2 g/L	Agentes inibidores e seletivos para <i>Lactobacillus</i> spp.
Citrato de amônio	C ₆ H ₁₄ O ₇ N ₂	2 g/L	
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	0,1 g/L	Fornecedores de cátions utilizados no metabolismo
Sulfato de Manganês	MnSO ₄	0,05 g/L	
Fosfato de Potássio	KH ₂ PO ₄	2 g/L	Agente tamponante responsável por equilibrar o pH
Monobásico Tween 80	-	1 mL/L	Agente surfactante que facilita a captura dos nutrientes pelos <i>Lactobacillus</i> spp.

Devido as suas propriedades, *L. rhamnosus* apresenta interesse industrial e tem sido uma das espécies utilizadas na elaboração de produtos probióticos disponíveis comercialmente, como por exemplo, iogurtes, bebidas a base de frutas e bebida a base de soja (SCHILLINGER, 1999; CHAMPAGNE & GARDNER, 2008; CHAMPAGNE *et al.*, 2009; SEGERS & LEBEER, 2014). No entanto, mesmo já sendo aplicado no desenvolvimento de alimentos probióticos, é válido ressaltar a necessidade de investigação a cerca de diferentes linhagens, já que *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) é, dentre essas, extensivamente a mais estudada (CEAPA *et al.*, 2016). Sendo assim, um bom exemplo de linhagem probiótica, que apresenta potencial para a geração de produtos funcionais, é *L. rhamnosus* (ATCC 7469).

Estudos recentes tem buscado demonstrar a aplicabilidade desse micro-organismo, seja de promoção à saúde ou produção de bebidas vegetarianas. Recentemente, *L. rhamnosus* (ATCC 7469) foi utilizado para elaboração de produtos à base de suco fermentado de Maracujá da Caatinga (*P. cinnamomata*) e suco não fermentado de cereja (*Cornus mas* L.), nos quais se manteve viável durante 28 dias e 21 dias, respectivamente (FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016). Além da aplicação alimentar, JORJÃO *et al.* (2015) demonstraram que essa

linhagem apresenta papel na modulação e/ou na estimulação de respostas imune de macrófagos, podendo assim conferir benefícios a saúde de seu hospedeiro, devido sua influência sobre sistema imune. No entanto, ainda são necessárias maiores investigações a cerca de *L. rhamnosus* (ATCC 7469), visto o potencial biotecnológico que possui, em especial à aplicabilidade no desenvolvimento de produtos funcionais, sendo assim relevante avaliar aspectos como seu comportamento em condições de estresse inerente ao sistema gastrointestinal e sua interação com prebióticos, a fim de potencializar seus níveis de sobrevivência, como por exemplo, pectina.

3.5. Considerações para Aplicação de Matrizes não Lácteas no Desenvolvimento de Produtos Probióticos

A partir da busca pela atividade de micro-organismos no sistema digestivo, diversos produtos já foram formulados com o propósito de direcionar linhagens probióticas à regiões do intestino. A utilização majoritária de produtos lácteos, como leite fermentado, iogurtes e queijos (BEVILACQUA *et al.*, 2013), tem trazido limitações para o consumo de alimentos probióticos, motivado por fatores como intolerância a lactose, alergia a proteína do leite, níveis de colesterol nos produtos lácteos fermentados e aumento pela procura de alimentos probióticos com caráter vegetariano (HEENAN *et al.*, 2004; RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010; ALVES *et al.*, 2016).

Dessa forma, a elaboração de produtos probióticos à base de frutas, legumes e cereais têm sido amplamente estudadas (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010; FONTELES *et al.*, 2011; MOUSAVI *et al.*, 2011; PEREIRA, MACIEL & RODRIGUES, 2011; PERES *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2013; BAKR, 2015), o que se deve especialmente ao fato de que extratos desses vegetais têm se mostrado fontes promissoras de substâncias antioxidantes e antitumorais (FARIAS, 2015).

Para que uma fonte vegetal seja considerada um bom veículo para linhagens probiótica, sua composição deve favorecer ao crescimento e viabilidade dos micro-organismos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Dentre esses produtos, os sucos de frutas tem se destacado, pois além de serem saudáveis e refrescantes,

possuírem carboidratos, minerais, vitaminas, fibras alimentares e antioxidantes, e podem ser consumidos regularmente, principalmente, por não apresentar substâncias alergênicas em sua composição (RAKIN *et al.*, 2007; RIVERA-ESPINOZA & GALLARDONAVARRO, 2010; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Para a produção de sucos contendo probióticos deve-se escolher bem a fruta a ser utilizada, sendo indicadas principalmente frutas topicais pelo aroma e sabor que possuem, podendo assim mascarar possíveis sabores desagradáveis (*off-flavours*) oriundo do metabolismo microbiano (LUCKOW *et al.*, 2006). No entanto, a dificuldade de adaptação dos micro-organismos às condições ácidas de várias frutas (FARIAS, 2016) limita a utilização de linhagem para a produção dessas bebidas. Dentre as espécies com capacidade de ser utilizada na elaboração de bebidas a base de suco de fruta está *Lactobacillus rhamnosus*, cujos estudos têm demonstrado sua capacidade de crescer e se manter viável em bebidas de diferentes matrizes vegetais como, por exemplo, laranja e abacaxi (SHEEHAN *et al.*, 2007). Isso demonstra o seu potencial para ser associada a outras bebidas a base de polpa de frutas, como por exemplo, o Maracujá da Caatinga, (*Passiflora cincinnata* Mast), planta tropical detentora de fruto com aroma característico e sabor exótico, atributos bastante apreciados por seus consumidores (SOUZA *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo: Preservação e Reativação

A cultura comercial de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, USA). A linhagem probiótica foi preservada em glicerol a 10 % (v/v) de acordo com LIEW *et al.* (2005) e CHANG & LIEW (2013). Para isso, a cultura comercial foi inoculada em 50 mL de caldo MRS (Merck, KGaA, Germany) e incubada em estufa (LABOR) durante 24 h a 37 °C. Em seguida, a suspensão celular foi inoculada em tubos inclinados com MRS-Agar (Merck, Alemanha, KGaA), e incubada por mais 24 h a temperatura de 37 °C. Após crescimento, as células contidas em cada tubo foram ressuspensas em glicerol 10 %

(v/v) e o volume total foi agrupado em Erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizado. Alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos eppendorfs, os quais foram armazenados em freezer a de -20 °C (Figura 4.1)

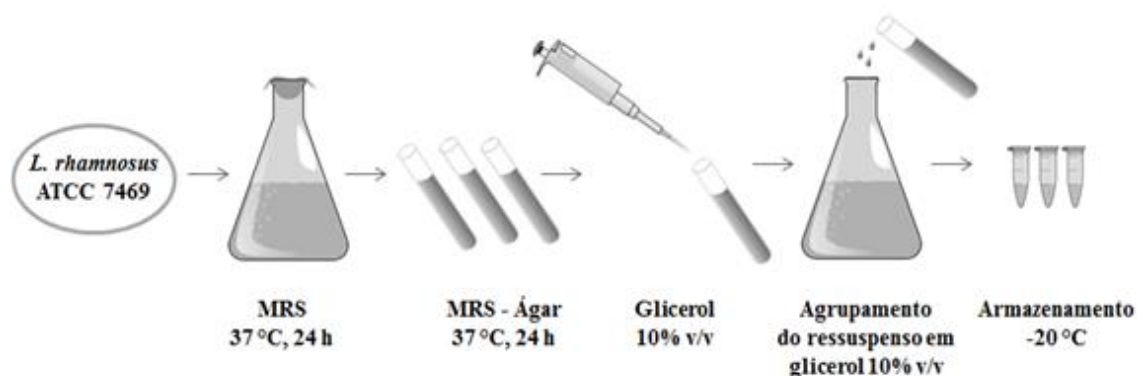


Figura 4.1 - Esquema ilustrativo do processo para preservação de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em glicerol 10 % (v/v) à - 20°C.

Por sua vez, para reativação do micro-organismo, um volume de 2 mL da suspensão de *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi inoculado em 25 mL do meio MRS e, em seguida, a cultura foi incubada a 37 °C por 24 horas em estufa (LABOR).

4.2. Maracujá da Caatinga

Os frutos do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) utilizados no presente trabalho foram coletados de acordo com o período de floração e coloração da casca em Tapiramutá (WGS84: 11° 50' 49'' S, 40° 47' 27'' W), Bahia, Brasil (Figura 4.2). Os frutos foram lavados e higienizados com água corrente e sabão líquido e, em seguida, foi realizada a obtenção da polpa e da farinha a partir das cascas.



Figura 4.2 - Frutos do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnatra* Mast.).

4.2.1. Polpa do Maracujá da Caatinga

A polpa do Maracujá da Caatinga foi obtida utilizando-se uma faca de aço inoxidável, para cortar ao meio, e peneira, para remoção das sementes. Após obtenção da polpa, procedeu-se com a homogeneização e divisão em frascos de vidro, os quais foram acondicionados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em freezer comum.

4.2.2. Farinha da Casca do Maracujá da Caatinga

A obtenção da farinha foi realizada de acordo com o procedimento utilizado por Santos et al. (2016). Após a etapa de remoção da polpa, as cascas foram cortadas em pequenos pedaços e secas em estufa (NOVATECNICA) a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight*. As cascas secas foram trituradas e tamisadas em moinho de faca (Marconi) no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) a 20 MESH. A farinha obtida foi embalada e armazenada em geladeira ($4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até posterior utilização.

4.2.3. Extração da pectina

A extração da pectina foi realizada a partir da farinha da casca do maracujá, utilizando o ácido cítrico (Santos *et al.*, 2016) Foram pesados 2,5 g da farinha da casca de Maracujá da Caatinga em frasco de Erlenmeyer de 250 mL e adicionados 125 mL de ácido cítrico 0,75 M. Em seguida, o frasco foi acondicionado em incubador rotativo (Tecnal, TE-422) a 50 °C e 150 rpm, durante 2 horas. Após a extração, a suspensão, ainda quente, foi filtrada, utilizando papel de filtro qualitativo com 12,5 cm de diâmetro. O filtrado foi arrefecido em geladeira (4 ± 1 °C) durante 24 horas e, posteriormente, o mesmo foi submetido ao processo de coagulação durante 1 hora, pela adição de etanol a 96 % (v/v). O material oriundo da coagulação foi separado por filtração em gaze e posteriormente lavado três vezes, primeiramente com 15 mL de etanol 70 % (v/v) e 0,5 % (v/v) de HCl, em seguida com 15 mL de etanol 70 % (v/v) para neutralizar o pH e, finalmente, com 15 mL de etanol a 96 % (v/v). Após este processo, o material resultante foi seco a 50 °C em estufa (Novatecnica, NT 514), durante 4 horas.

O rendimento gravimétrico do procedimento da extração (Y) foi determinado de acordo com Equação (1).

$$Y = \left(\frac{M}{FC} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde, M corresponde a massa seca do material extraído (em gramas) e FC a massa seca inicial da farinha da casca do Maracujá da Caatinga (em gramas).

4.3. Formulações das Bebidas Probióticas

4.3.1. Meio de Cultura à Base da Polpa do Maracujá da Caatinga

O preparo do meio de cultura à base da polpa do Maracujá da Caatinga (*P. cincinnatra* Mast.) foi realizado tomando como base o estudo de Farias et al. (2016). Para

isso, no preparo, foram utilizados 20 % (v/v) da polpa, 10 % (m/v) de sacarose e água necessária para completar o volume desejado. Após a formulação, o pH do meio foi ajustado para $3,5 \pm 2$ com HCL (1 M) e este foi pasteurizado em banho Maria durante 35 minutos a 67 ± 2 °C, com posterior resfriamento em banho com gelo.

4.3.2. Produção das Bebidas Não Fermentadas

Para a formulação das bebidas não fermentadas, o micro-organismo foi reativado como descrito no item 4.1 e, em seguida, uma alíquota de 2,5 mL da suspensão microbiana foi inoculada em 22,5 mL do meio MRS em frasco de Erlenmeyer de 250 mL. O frasco foi acondicionado em estufa (Labor) a 37 °C, durante 24 horas. Após esse período, o volume total da suspensão foi centrifugado (THERMO, Electron Corporation) a 10.000 rpm e 4 °C, durante 15 minutos. As células sedimentadas resultantes da centrifugação foram ressuspensas em 5 mL de solução salina 0,9 % (m/v). Após essa etapa, um volume equivalente a 10 % v/v da suspensão celular foi transferido para cada um dos frascos, contendo o meio de cultura à base da polpa do Maracujá da Caatinga, cuja preparação foi descrita no item 4.3.1. Foram elaboradas quatro bebidas para estudo piloto, sem pectina e sem sacarose (SPSS), sem pectina e com sacarose (SPCS), com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e com pectina extraída e com sacarose (CPextCS). Por sua vez, outras duas bebidas foram produzidas contendo pectina comercial (NFCP) ou extraída da farinha da casca do Maracujá da Caatinga (NFCPext), as quais foram acondicionadas em geladeira a 4 °C, para posterior avaliação do estoque. Em todas as condições necessárias, a concentração de pectina foi 20 g/L (Nazarro *et al.*, 2012).

4.3.3. Produção das Bebidas Fermentadas

A formulação das bebidas fermentadas seguiu o mesmo procedimento das não fermentadas, com uma etapa de fermentação (37 °C; 24 horas) antes do condicionamento em geladeira a 4 °C, para a avaliação do estoque refrigerado. Da mesma forma das bebidas não fermentadas, foram elaboradas quatro bebidas para

estudo piloto (SPSS), SPCS, CPCS e CPextCS) e duas bebidas, pectina comercial (FCP) ou com pectina extraída (FCPext), para posterior avaliação de estoque.

4.4. Fermentações em Meios Contendo Pectina: Avaliação do Consumo de Pectina por *L. rhamnosus* ATCC 7469

Para verificar a possibilidade de consumo da pectina pela formação dos ácidos butírico e propiônico, AGCC, foram realizadas fermentações a 37 °C em meio MRS, sem adição de pectina e com pectina comercial (20 g/L) , e das bebidas sem adição de sacarose, com pectina comercial (20 g/L) ou extraída (20 g/L), durante 24 horas. Para isso, foram coletadas amostras após o período de 24 e 48 horas, as quais foram avaliadas de acordo com as concentrações dos AGCC em CLAE como descrito no item 4.5.7.

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Determinação da Umidade

A umidade da farinha da casca do Maracujá da Caatinga foi determinada utilizando um analisador de umidade (Shimadzu, MOC63u).

4.5.2. Determinação do Grau de Esterificação

A literatura utilizada como base para essa etapa foi descrita por Bocek et al. (2001). Para isso, foram pesados 0,2 g de pectina e a mesma foi umedecida em um recipiente com 1 mL de etanol (96 %). Em seguida, a pectina e o etanol foram diluídos em 20 mL de água destilada a 40 °C sob agitação de 100 rpm em mesa agitadora durante 2 horas. Em seguida, a solução resultante foi titulada com NaOH (0,1 M) na presença de fenolftaleína até atingir coloração rósea, o que ocorreu quando o pH atingiu valores entre 8,0 – 8,2. Posteriormente, foi calculado o número de carboxilas livres em porcentagem (Kf) pela Equação (2).

$$Kf (\%) = \frac{MNaOH(\frac{mol}{L}) VNaOH(L) \times 0,045(\frac{g}{mol})}{a (g)} \times 100 \quad (2)$$

Para a Equação (2) acima, foi considerado 0,045 como valor corresponde à massa molar do grupo carboxila para um litro e **a** como porção ponderada entre pectina e água (g).

Logo após foi realizada a determinação dos grupos carboxilas esterificados (Ke). Para isso, adicionou-se 10 mL de NaOH a 0,1 M para neutralizar os ácidos poligalacturônicos após determinação dos grupos carboxilas livres. Em seguida, a amostra foi agitada (100 rpm) por mais 2 h a temperatura ambiente (29 ± 2 °C) para garantir a total saponificação dos grupos carboxila esterificados. Posteriormente foram colocados 10 mL de HCl (0,1 M) e o excesso do mesmo neutralizado com NaOH (0,1 M). O número de grupos esterificados foi calculado através do volume gasto de NaOH (0,1 M) pela Equação (3) abaixo:

$$Ke (\%) = \frac{MNaOH(\frac{mol}{L}) VNaOH(L) \times 0,045(\frac{g}{mol})}{a (g)} \times 100 \quad (3)$$

Seguidamente determinou-se o número total (Kt) de grupos COOH, que é resultado da soma dos grupamentos livres e esterificados ($Kt = Ke + Kf$), para em seguida ser determinado o grau de esterificação (ED) em porcentagem através da seguinte fórmula:

$$ED (\%) = \left(\frac{Ke}{Kt} \right) \times 100 \quad (5)$$

4.5.3. Análises em Polpa do Maracujá da Caatinga

As polpas do Maracujá da Caatinga não pasteurizada (PNP) e pasteurizada (PP) foram submetidas à análise microbiológica utilizando-se o método 967.26 para *Salmonella* sp. e o método 991.14 para *Coliformes* de acordo com a AOAC (2002). A determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix), acidez titulável, cinzas, umidade, proteínas e lipídeo foram realizados de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008), tanto para a PNP quanto para a PP. Para cinzas utilizou-se o método de incineração em Mufla a 550 °C e para umidade foi feita dessecação por secagem direta em estufa a 105°C. Por sua vez, a análise físico-química para proteínas foi realizada através do método de Kjeldahl e de lipídeo pelo método de Soxhlet.

4.5.4. Determinação do pH

Em todas as situações necessárias a determinação e/ou ajuste do pH foram realizados utilizando-se um potenciômetro digital (JENWAY 3510).

4.5.5. Determinação da Viabilidade

A viabilidade em Unidades Formadoras de Colônia por mililitros (UFC/mL) para *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi determinada através da realização de diluições seriadas, em solução salina (0,9 % NaCl) e técnica de espalhamento em placas de Petri, com meio MRS e 20 g/L de ágar em cabine de fluxo laminar previamente esterilizada por radiação ultravioleta (UV). Após inoculação, as placas foram incubadas em estufa para cultura bacteriológica (LABOR) a 37°C durante 48 horas (Figura 4.3).

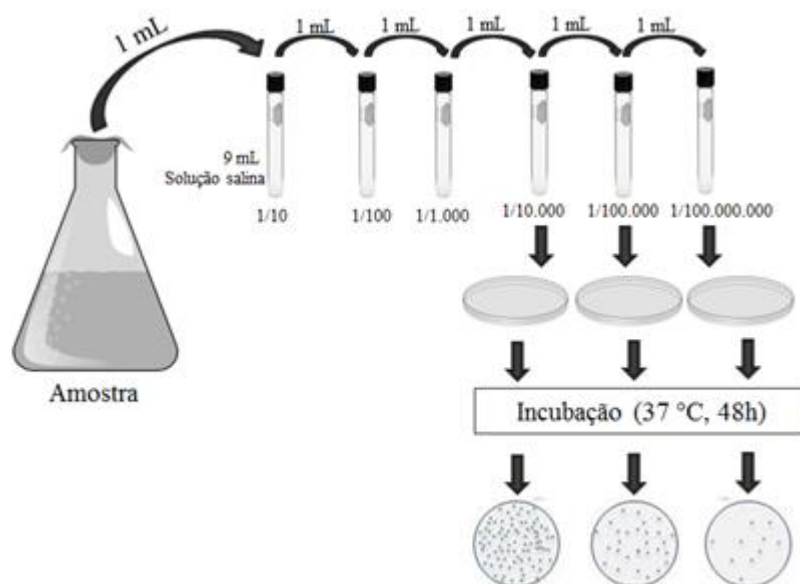


Figura 4.3 - Esquema ilustrativo para a determinação da viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469.

4.5.6. Resistência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 às Condições de Simulação Gastrointestinal

A metodologia utilizada foi baseada no trabalho de Buriti et al. (2010). Através desta, avaliou-se a tolerância de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 às condições de simulação gástrica e intestinal por meio da determinação de sua viabilidade e dos índices de sobrevivência (%).

Foi utilizado volume inicial de 30 mL para cada amostra contendo as células de *L. rhamnosus* ATCC 7469. Inicialmente o pH foi ajustado para 2,0 com solução de HCl (5,0 M) e massa equivalente à concentração de 3 g/L de pepsina (Dinâmica, SP, Brasil). Em seguida, o volume foi desposado em Erlenmeyer de 250 mL estéril e direcionado a incubadora rotativa (TECNAL) a 150 rpm e temperatura de 37 °C durante 2 horas.

Nesta fase, as amostras tiveram seu pH ajustado inicialmente para 5,0 com solução alcalina (NaOH e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) e em seguida foram adicionados 10 g/L de sais biliares (HiMedia, Mumbai, Índia) e 1 g/L de pancreatina (Êxodo Científica, SP,

Brasil), para que assim as amostras fossem submetidas à incubadora rotativa (TECNAL) (150 rpm, 37 °C) por 2 horas. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,0 utilizando novamente a solução de NaOH e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ e as concentrações de sais biliares e pancreatina foram reajustados, para 10 g/L e 1 g/L respectivamente, devido à variação no volume das soluções decorrente do ajuste do pH.

No início da fase gástrica (V_i) e no final da fase entérica (V_f) foi determinada a viabilidade de *L. rhamnosus* em UFC/mL^{-1} , a partir das quais se calculou os índices de sobrevivência (s) do micro-organismo nas condições de simulação gastrointestinal, a partir da Equação (6):

$$s (\%) = V_i/V_f \times 100 \quad (6)$$

A fim de tornar o teste de simulação gastrointestinal mais compreensível, a Figura 4.4 trás em si um esquema ilustrativo referente à metodologia descrita anteriormente.

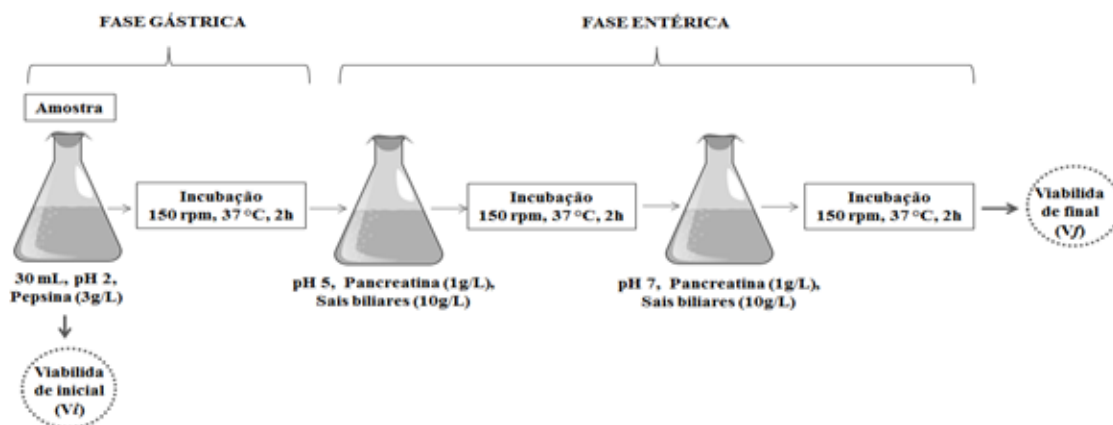


Figura 4.4 - Ilustração esquemática do teste de simulação gastrointestinal para verificação da resistência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

4.5.7. Determinação de Carboidratos e de Ácidos Orgânicos

A determinação de sacarose, glicose e frutose foi realizada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detector de índice de refração (RI), coluna de troca iônica com 300 milímetros x 7,8 milímetros e 9 μM de tamanho de partículas (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, EUA), temperatura de 40° C, H_2SO_4 (5 mM) como fase móvel e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. A determinação dos ácidos orgânicos, cítrico, láctico, málico, ascórbico, butírico e propiônico, também foram realizados em CLAE na mesma condição descritas para quantificação dos carboidratos, diferindo o detector utilizado que foi de arranjo de diodos (DAD) com comprimento de onda ajustado para 190-800 nm e temperatura 29 °C. O equipamento utilizado inclui bomba quaternária acoplada a desgaseificador (DGU-20A5r), forno para controlar a temperatura da coluna e injetor automático. O software utilizado para a obtenção dos dados foi o LC-Solutions fabricado pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão).

Para cada composto foi construída curva padrão para quantificação dos mesmos nas amostras analisadas. A construção da curva de sacarose foi realizada a partir de solução mãe com concentração de 7 g/L. Com tal solução construiu-se uma curva de cinco pontos cujos volumes injetados foram 5, 10, 20, 30 e 40 μL , correspondendo às massas de 35, 70, 140, 210 e 280 μg , o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 1. As curvas da glicose e frutose foram construídas a partir de soluções de 1 g/L. Para a glicose foi feita curva de quatro pontos (10, 15, 20 e 25 μg) com $R^2 = 1$ e para a frutose foi construída curva de seis pontos (10, 15, 20, 25, 30 e 35 μg) com $R^2 = 0,9996$. Para os ácidos orgânicos, cítrico, láctico, málico e ascórbico, foram construídos curvas a partir de solução mãe contendo concentração 1 g/L para cada ácido. As curvas foram construídas a partir da injeção de cinco pontos para às massas de 1, 3, 6, 10 e 20 μg . Os coeficientes de determinação para os ácidos cítrico, láctico, málico e ascórbico foram maiores que 0,999.

4.6. Análises Estatísticas

Para a realização das análises estatísticas, os valores médios para viabilidade do micro-organismo foi obtida a partir de triplicatas experimentais e as demais análises

foram feitas em duplicata. Os dados obtidos foram analisados para o teste de variância (ANOVA) e de Tukey a partir do programa PAST software (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) e nível de significância de 5 % ($\alpha \leq 0.05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Maracujá da Caatinga: Polpa e Casca

A polpa *in natura* do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) teve seu potencial nutricional avaliado de acordo com o teor de sólidos solúveis em °Brix, acidez, pH e carboidratos (sacarose, glicose e frutose) (Tabela 5.1). A partir da análise desses parâmetros, verificou-se que a polpa *in natura* se enquadra nos padrões de identidade e qualidade exigidos pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Sólidos solúveis = Valor mínimo 11,00 °Brix; Acidez = Valor mínimo 2,50 g/100g; pH = 2,70 – 3,80; Açúcares naturais do Maracujá (carboidratos) = Valor máximo 18,00 g/100 g) para *Passiflora* sp. (MAPA, 2000), demonstrando assim estar apta ao consumo humano.

Tabela 5.1 - Caracterização físico-química da polpa *in natura* do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) e sua comparação com estudos realizados por Araújo *et al.*, 2009, Pita, 2012 e Farias, 2016.

Análises	Araújo et al., 2009	Pita, 2012	Farias, 2016	Trabalho atual
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	14,20 ± 0,00	11,43 ± 0,00	-	11,00 ± 0,00
Acidez Titulável (g/100 g)	3,80 ± 0,00	5,71 ± 0,00	-	82,33 ± 0,14
pH	3,00 ± 0,00	-	3 ± 0,20	3,2 ± 0,01
Umidade (g/100 g)	88,00 ± 0,00	-	-	90,02 ± 0,11
Cinzas (g/100 g)	-	-	-	0,80 ± 0,09
Proteínas (g/100 g)	-	-	-	0,84 ± 0,06
Lipídios (g/100 g)	-	-	-	3,83 ± 0,30
Sacarose (g/100 g)	1,02 ± 0,00	-	-	0,68 ± 0,01
Glicose (g/100 g)	7,83 ± 0,00	-	-	0,19 ± 0,00
Frutose (g/100 g)	-	-	-	1,79 ± 0,00
Ácido Cítrico (g/100 g)	-	-	0,45 ± 0,00	0,47 ± 0,03
Ácido Ascórbico (mg/100 g)	10,73 ± 0,00	21,21 ± 0,00	-	52,01 ± 0,00

Trabalhos têm demonstrado características do perfil físico-químico da polpa desse fruto, e esses foram utilizados como parâmetro comparativo dos dados obtidos no

presente estudo (Tabela 5.1). Os valores de sólidos solúveis totais e pH são semelhantes aos verificados por Pita (2012), Araújo et al. (2009) e Farias et al. (2016). No entanto, os valores de acidez total do presente trabalho foram superiores aos observados por Araújo et al. (2009) e Pita (2012), o que pode estar relacionado a fatores como tempo de maturidade dos frutos e diferentes condições ambientais das regiões de colheita.

Os valores para umidade da polpa foram semelhantes os encontrado por Araújo et al. (2009). Por sua vez, a concentração de sacarose foi inferior àquela relatada pelo mesmo autor. O carboidrato com maior concentração foi frutose, valor que se justifica, visto que é o principal açúcar das frutas (JUNIOR, 2008).

A polpa apresentou teor de ácido cítrico e pH próximos àqueles encontrados por Farias (2016). Nos demais trabalhos não foram mencionados o ácido cítrico, uma vez que esses autores registram apenas a acidez titulável e não determinam os ácidos orgânicos por CLAE. O teor de ácido ascórbico foi maior do que aqueles encontrados por Araújo et al. (2009) e Pita (2012), o que pode estar relacionado à utilização de diferentes métodos de análise, ressaltando a necessidade de se estabelecer, através de maiores investigações, a padronização para análises físico-químicas da polpa dessa espécie, visando confirmar e comparar os aspectos experimentais capazes de interferir na quantificação de seus constituintes.

Os valores quantificados para cinzas ($0,80 \pm 0,09$ g/100 g), proteínas ($0,84 \pm 0,06$ g/100 g) e lipídeos ($3,83 \pm 0,30$ g/100 g) não haviam sido determinados anteriormente para a polpa do Maracujá da Caatinga. Entretanto, segundo Romero-Rodriguez et al. (1994), o Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f.) apresenta em sua polpa 0,50 g/100 g de cinzas e 3,00 g/100 g de proteínas, por sua vez, Morton (1987) observou para esse mesmo fruto 0,80 g/100 g de cinzas e 2,20 g/100 g de proteínas. Esses dados demonstram que o Maracujá da Caatinga apresenta concentrações semelhantes para cinzas. No entanto, possui menor concentração de proteína se comparado com o Maracujá Amarelo. Com relação ao teor de lipídeo, constatou-se que a polpa do Maracujá da Caatinga apresentou valores semelhantes aos detectados por Canuto et al. (2010) para polpa de açaí ($4,6 \pm 0,0$ g/100 g), sendo superior a polpa de outros frutos como acerola ($0,2 \pm 0,1$ g/100 g), cajá ($0,2 \pm 0,1$ g/100 g), caju ($0,1 \pm 0,1$ g/100 g) e graviola ($0,1 \pm 0,0$ g/100 g) (CANUTO *et al.*, 2010).

Segundo Campos (2010), fatores como estado de maturação, idade da planta, condições climáticas, estado nutricional, polinização, fertilização do solo e manejo da água utilizada na irrigação podem exercer influência sobre a qualidade dos frutos do gênero *Passiflora*. Dessa maneira, as características sensoriais e nutricionais do fruto pode variar de acordo com a localidade do plantio, período de colheita e tipo de manejo que a planta estará sendo submetida, podendo assim exercer variações no padrão físico-químico dos frutos de uma mesma espécie. As características climáticas, assim como disponibilidade de água, e exposição solar de plantas podem influenciar no crescimento e na qualidade dos frutos (FARIAS, 2016).

5.1.1. Avaliação da Influência da Pasteurização da Polpa

Por ser uma técnica consagrada na redução da carga microbiana em líquidos sensíveis ao calor, a pasteurização pode ser utilizada para garantir a eliminação de micro-organismos patógenos para os sucos de fruta, a fim de garantir sua integridade microbiana e nutricional, aumentando consideravelmente o prazo de validade de líquidos perecíveis (MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP, 2010). Dessa forma, foi realizada, a fim de verificar a influência desse processo térmico sobre as características físico-químicas da polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), sua caracterização antes e após tal procedimento. A partir dos resultados obtidos, observou-se que os sólidos solúveis totais (°Brix), cinzas, proteínas, lipídeos, sacarose e ácido cítrico não apresentaram diferença significativa antes e após a pasteurização, em contraste ao observado para acidez, pH, umidade, glicose e frutose (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Comparação da composição físico-química da polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) antes (PNP) e após a pasteurização (PP).

Análises	PNP	PP
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	11± 0,00	11± 0,00
Acidez (g/100 g)	82,33 ± 0,14*	91,49 ± 0,52*
pH	3,20 ± 0,01*	3,13 ± 0,005*
Umidade (g/100 g)	90,02 ± 0,11*	88,22 ± 0,10*
Cinzas (g/100 g)	0,80 ± 0,09	0,81 ± 0,035
Proteínas (g/100 g)	0,84 ± 0,06	1,08 ± 0,02
Lipídios (g/100 g)	3,83 ± 0,30	3,82 ± 0,66
Sacarose (g/100 g)	0,68 ± 0,01	0,69 ± 0,00
Glicose (g/100 g)	0,19 ± 0,00*	0,17 ± 0,00*
Frutose (g/100 g)	1,79 ± 0,00*	1,63 ± 0,01*
Ácido Cítrico (g/100 g)	0,47 ± 0,03	0,47 ± 0,02

*Valores com diferença estatística para $P \leq 0,05$

Em ambos os casos, polpa não pasteurizada (PNP) e polpa pasteurizada (PP), o Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) revelou seu potencial nutricional, visto que os sólidos solúveis totais, acidez, pH e os carboidratos (glicose e frutose) se enquadraram nos padrões de identidade e qualidade para polpa de *Passiflora* sp. exigidos pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Sólidos solúveis = Valor mínimo 11,00 °Brix; Acidez = Valor mínimo 2,50 g/100 g; pH = 2,70 – 3,80; Açúcares naturais do Maracujá (carboidratos) = Valor máximo 18,00 g/100 g) (MAPA, 2000). A pasteurização exerceu influência sobre alguns aspectos físico-químicos da polpa de *Passiflora cincinnata* Mast., o que provavelmente está relacionado à evaporação de amostra durante o processo. Entretanto, isto não foi capaz de prejudicar seu padrão de qualidade e seus atributos nutricionais.

A partir da análise microbiológica da polpa pasteurizada, não foi verificada a presença de *Salmonella* sp. ou de *Coliformes* termo tolerantes, demonstrando assim, a eficiência da pasteurização.

5.1.2. Farinha da Casca: Rendimento Gravimétrico e Grau de Esterificação da Pectina

O rendimento médio obtido na extração da pectina da farinha da casca do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) foi cerca de 55 %. As condições utilizadas no presente trabalho (50 °C, 150 rpm e ácido cítrico 0,75 M) garantiram rendimento semelhante ao observado por Santos (2015) ($Y = 54,69$ %) para extração de pectina com ácido cítrico (0,75 M) da farinha da casca de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em banho de ultrassom, e superior para o quantificado pelo mesmo autor ($Y = 30,22$ %) para extração em incubador rotativo (27 °C, 150 rpm e ácido cítrico 0,75 M).

Outros autores exploraram a extração de pectina a partir da casca de Maracujá Amarelo, cujo rendimento variou de acordo com o tipo de agente extrator e tipo de energia utilizada para extração. Kulkarni & Vijayanant et al. (2010) obtiveram rendimento de 14,80 % a partir da casca do Maracujá Amarelo através da utilização de HCl concentrado como agente extrator a 98 °C. Por sua vez, Seixas et al. (2014) alcançaram rendimento de 30,30 % a partir da farinha da casca do Maracujá Amarelo por meio da utilização de ácido tartárico e micro-ondas.

Recentemente tem-se buscado matrizes alternativas para a produção de pectina a partir de rejeitos indústrias, como casca e bagaço de frutas, as quais geralmente são descartadas juntamente com os atributos nutricionais que possuem. A extração de pectina tem sido demonstrada para bagaço de uva ($Y = 32,30$ %) (MINJARES-FUENTES *et al.*, 2014), casca de toranja ($Y = 26,74$ %) (XU *et al.*, 2014) e casca de romã ($Y = 23,87$ %) (MOORTHY *et al.*, 2015). No entanto seus rendimentos foram inferiores em comparação a farinha da casca do Maracujá da Caatinga, demonstrando assim sua potencialidade para ser utilizado como matriz vegetal na obtenção de pectina, sendo necessárias maiores investigações a cerca dos fatores que podem vir a influenciar no rendimento da extração. A extração de pectina pode ser influenciada por diversos aspectos, como matriz vegetal, agente extrator, temperatura e tipo de energia utilizada para extração.

O grau de esterificação (DE) foi cerca de 14 %, ou seja, a pectina proveniente da casca do Maracujá da Caatinga apresenta baixo grau de esterificação, em contraste do observado para a pectina comercial (Dinâmica), cujo grau de esterificação foi 82 %.

O DE é um dos aspectos mais importantes da estrutura da pectina, sendo sua determinação fundamental, já que se correlaciona diretamente com a propriedade de formação do gel, direcionando assim a utilização adequada da pectina na indústria (FERTONANI, 2005). O baixo grau de esterificação encontrado no presente trabalho parece ser uma característica inerente das espécies de maracujá, uma vez que também foi observada para o Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), segundo Santos et al. (2016). Pectinas detentoras de baixo DE também apresentam capacidade de formar gel, no entanto em condições diferentes das exigidas para as de alto DE. Porém, essas pectinas vêm ganhando destaque nos últimos anos por atuarem seletivamente no crescimento de bactérias intestinais associadas à saúde, o que se dá principalmente por serem fermentadas mais facilmente do que as pectinas com alto DE, devido ao menor número de metilações que possuem, podendo assim ter uma maior taxa de formação de AGCC (FISSORE, 2015).

5.2. Fermentações em Meios Contendo Pectina

O micro-organismo *L. rhamnosus* ATCC 7469 não se apresentou apto a realizar a metabolização de pectina quando presente em meio MRS (Comercial) ou na bebida de Maracujá da Caatinga (Comercial ou Extraída), já que, durante intervalo de 24 e 48 horas, não foi detectada a presença dos AGCC butírico e propiônico. Estes ácidos são componentes essenciais do metabolismo dos hidratos de carbono que são utilizados pelo organismo do hospedeiro como fonte de energia celular (AL-SHERAJI et al., 2013). Sendo assim, os dados demonstram que a associação entre pectina e *L. rhamnosus* ATCC 7469 não apresenta capacidade de gerar produtos simbióticos, ou seja, quando um probiótico e um prebiótico estão combinados (SAAD, 2006), cuja interação entre esses pode favorecer suas atuações após consumo. Diferentemente do observado para outras bactérias prebióticas, como *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, a qual apresentou capacidade de produzir ácidos propiônico e butírico (Nazarro et al., 2012). Dessa forma, os produtos desenvolvidos no presente trabalho são considerados funcionais de caráter prebiótico e probiótico, mas não simbióticos, visto que a pectina presente numa possível bebida probiótica fermentada contendo *L. rhamnosus* ATCC 7469 seria consumida apenas no intestino.

5.3. Influência da Pectina e da Sacarose na Sobrevivência do Microrganismo nas Condições Gastrointestinais Simuladas

O perfil da viabilidade das bebidas prebióticas não fermentadas antes e após a simulação das condições gastrointestinais pode ser visualizado na Figura 5.1. Todas apresentaram decaimento significativo desse parâmetro tendo viabilidade final acima de 2 Log UFC/mL.

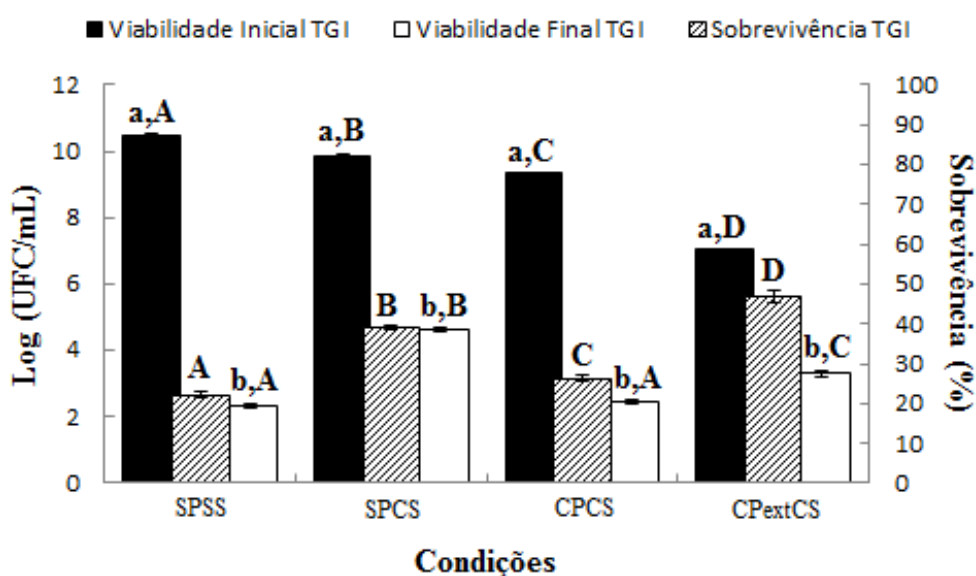


Figura 5.1 – Viabilidade Inicial e final (Log UFC/mL) de *L. rhamnosus* ATCC7469 para Teste Gastrointestinal para as bebidas prebióticas não fermentadas (Sem pectina e sem sacarose (SPSS), Sem pectina e com sacarose (SPCS), Com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e Com Pectina extraída e com sacarose (CPextCS) e seus respectivos índices de sobrevivência (%). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre a viabilidade inicial e final do TGI para cada grupo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes grupos.

A bebida prebiótica sem pectina e com sacarose (SPCS) demonstrou maior viabilidade final, sendo seguida da bebida com pectina extraída e sacarose (CPextCS). Por outro lado, as bebidas sem pectina e sem sacarose (SPSS) e com pectina comercial e

sacarose (CPCS) expressaram as menores viabilidades finais. Assim como observado no presente trabalho, Parkar et al. (2010) verificaram que a adição de pectina comercial apresentou influência negativa sobre a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* e que esta redução está diretamente relacionada ao aumento da concentração dessa molécula. Sendo assim, mesmo tendo apresentado a segunda melhor viabilidade, a condição da bebida prebiótica CPextCS manifestou melhor resultado para o micro-organismo após simulação gastrointestinal, já que sua sobrevivência aproximou-se de 50 %.

A partir das bebidas probióticas SPSS e SPCS, é possível perceber que a presença da sacarose provavelmente influencia positivamente a sobrevivência do micro-organismo, o que justifica sua adição, além dos seus atributos de palatabilidade. Por sua vez, a bebida CpexCS apresentou maior sobrevivência em detrimento da bebida SPCS, o que se dá pela presença da pectina extraída, a qual influenciou positivamente o micro-organismo e sua capacidade de resistência. Além da presença de sacarose, o tipo de pectina parece influenciar diferentemente a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469 nas condições gastrointestinais, já que, quando a diferença entre as bebidas foi a o tipo de pectina aplicada (CPCS e CPextCS) os índices de sobrevivência se diferiram, sendo a condição com pectina extraída a detentora de melhor resultado.

Comparando-se a sobrevivência entre as bebidas sem pectina e sem sacarose (SPSS), com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e com pectina extraída e com sacarose (CPextCS) é possível perceber que a adição de pectina juntamente com sacarose melhorou a sobrevivência do micro-organismo. No entanto, levando-se em consideração a bebida probiótica SPCS verifica-se que a adição da pectina comercial (CPCS) influenciou negativamente a sobrevivência do micro-organismo, diferentemente do observado para a pectina extraída (CPextCS) que potencializou esses parâmetro para bebidas não fermentadas.

Por sua vez, a viabilidade das bebidas prebióticas fermentadas antes e após a simulação das condições gastrointestinais pode ser visualizado na Figura 5.2, onde é observado, assim como demonstrado anteriormente para as bebidas não fermentadas, decaimento na viabilidade final do micro-organismo para todas as situações analisadas. A menor viabilidade final (2 Log UFC/mL) foi demonstrada para a bebida com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e a maior viabilidade final foi para a bebida sem pectina e sem sacarose (SPSS) com 4,50 Log UFC/mL. A viabilidade final entre a

bebida SPSS e CPextCS não apresentaram diferença, no entanto a sobrevivência da condição contendo pectina extraída foi maior.

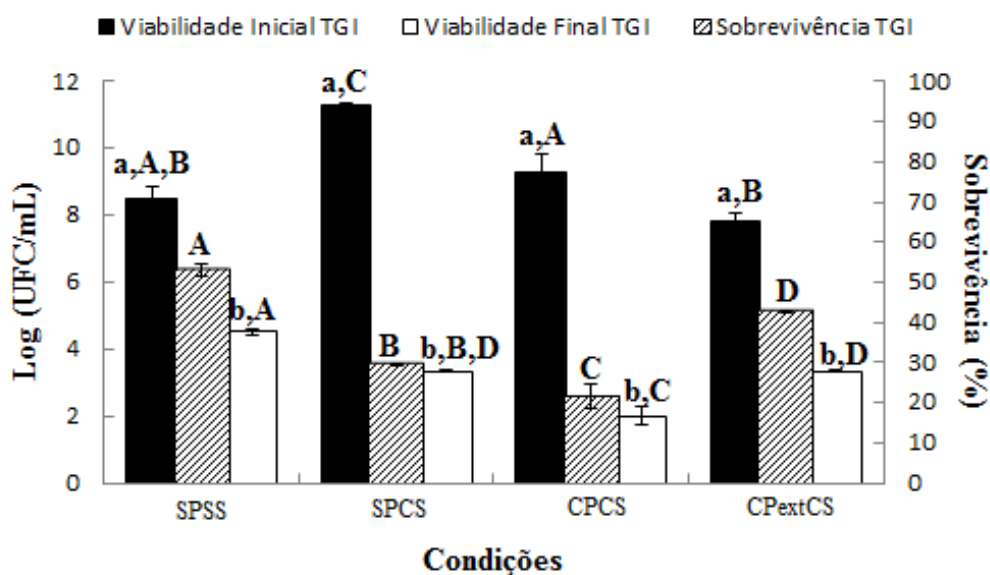


Figura 5.2 – Viabilidade Inicial e final (Log UFC/mL) de *L. rhamnosus* ATCC7469 para Teste Gastrointestinal para as bebidas probióticas fermentadas (Sem pectina e sem sacarose (SPSS), Sem pectina e com sacarose (SPCS), Com pectina comercial e com sacarose (CPCS) e Com Pectina extraída e com sacarose (CPextCS) e seus respectivos índices de sobrevivência (%). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre a viabilidade inicial e final do TGI para cada grupo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes grupos.

Dentre todas as condições, a bebida SPSS deteve, além da maior viabilidade final, a maior sobrevivência para o *L. rhamnosus* ATCC7469, seguida da bebida CPextCS, mesmo sua viabilidade final tendo sido semelhante da bebida SPCS. Ao se avaliar a relação entre as bebidas probióticas contendo pectina comercial (CPCS) e extraída (CPextCS) é possível verificar, assim como visto para as bebidas não fermentadas, que a pectina extraída proporcionou melhor sobrevivência para a linhagem na simulação das condições gastrointestinais quando comparada a pectina comercial. Além disso, verificou-se a partir da comparação entre as bebidas SPSS e SPCS que a adição de sacarose nessa situação prejudicou a sobrevivência do micro-organismo nas condições gastrointestinais.

Tanto para as bebidas não fermentadas quanto fermentadas, é possível perceber, ao se comparar as condições SPSS e SPCS para as Figuras 5.1 e 5.2, que o perfil da sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC7469 foi influenciado inversamente pela adição de sacarose. Ou seja, a adição desse aditivo para bebida não fermentada potencializou a sobrevivência do probiótico, por outro lado influenciou negativamente a sobrevivência quando em bebida fermentada. Em contrapartida, tanto para as bebidas não fermentadas quanto para as fermentadas a adição de pectina comercial promoveu decaimento na sobrevivência do micro-organismo quando comparado com a bebida SPCS, ao contrário do observado quando realizada a adição da pectina extraída, que em ambos os casos potencializou essa sobrevivência. Dessa forma, as bebidas probióticas contendo pectina extraída expressaram melhores resultados para a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469, tanto quando em meio não fermentado quanto em fermentado, sendo, por conseguinte a bebida não fermentada com pectina extraída a que apresentou melhor índice de sobrevivência, sendo este de aproximadamente 50 %.

5.4. Avaliação do Estoque Refrigerado das Bebidas Funcionais Contendo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 e Pectina

Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 teve sua viabilidade acompanhada para as quatro bebidas funcionais à base do Maracujá da Caatinga que foram avaliadas: FCP (fermentada e com pectina comercial), FCPext (fermentada e com pectina extraída), NFCP (não fermentada e com pectina comercial) e NFCPext (não fermentada e com pectina extraída). Para condições com pectina extraída (FCPext, NFCPext) foi observado que o estoque manteve-se viável nas condições simuladas do trato gastrointestinal até 28 dias. Por outro lado, para as condições contendo pectina comercial (FCP, NFCP) esse tempo alcançou os 56 dias de estoque. As viabilidades no início e no final do estoque, para as quatro condições, FCP, NFCP, FCPext e NFCPext, são apresentadas na Figura 5.3.

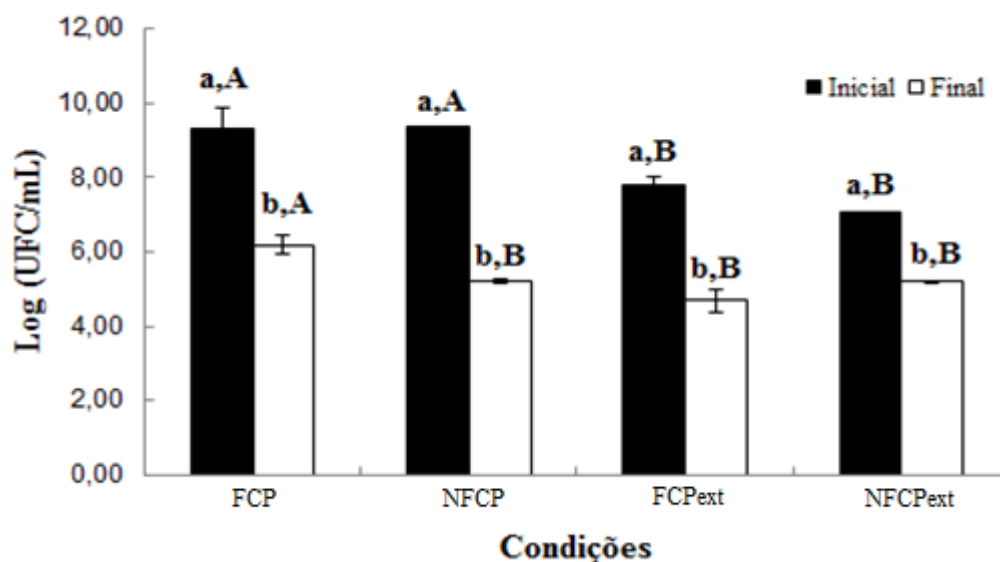


Figura 5.3 - Viabilidade (Log UFC/mL) do *L. rhamnosus* ATCC 7469 no início e no final do período de estoque refrigerado (4 °C) para as quatro condições: (FCP) Fermentado com pectina comercial, (NFCP) Não fermentado com pectina comercial, (FCPext) Fermentado com pectina extraída e (NFCPext) Não fermentado com pectina extraída. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) para a viabilidade durante o tempo (inicial e final) no mesmo estoque; Diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) durante o tempo para os diferentes estoques.

Para todas as condições (FCP, NFCP, FCPext e NFCPext) foi verificado que as viabilidades diminuíram significativamente entre o período inicial e final do estoque (Figura 5.3), o que deve estar relacionado à atividade metabólica do micro-organismo e a menor disponibilidade de nutrientes no meio. Considerando o estoque (56 dias) das bebidas contendo a pectina comercial (FCP e NFCP), observa-se uma queda na viabilidade de 33,36 % para a bebida fermentada e de 44,15 % para a bebida não fermentada. No que diz respeito às bebidas com a pectina extraída, FCPext e NFCPext, as viabilidades, com 28 dias, diminuíram 39,77 % e 26,30 %, respectivamente, em relação às viabilidades no início do estoque.

As viabilidades iniciais e finais, assim como os valores de sobrevivência do *L. rhamnosus* ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais são apresentados nas Figuras 5.4 (A e B). A Figura 5.4 A trás os dados obtidos no primeiro dia do período de estoque das bebidas probiótica não fermentadas e fermentadas. Por sua vez,

a Figura 5.4 B apresenta os dados obtidos para o período final do estoque, sendo este de 56 dias para as bebidas fermentadas e não fermentada com pectina comercial (FCP e NFCP), e 28 dias para as bebidas fermentadas e não fermentada com pectina extraída da farinha da casca do Maracujá da Caatinga (FCPext e NFCPext).

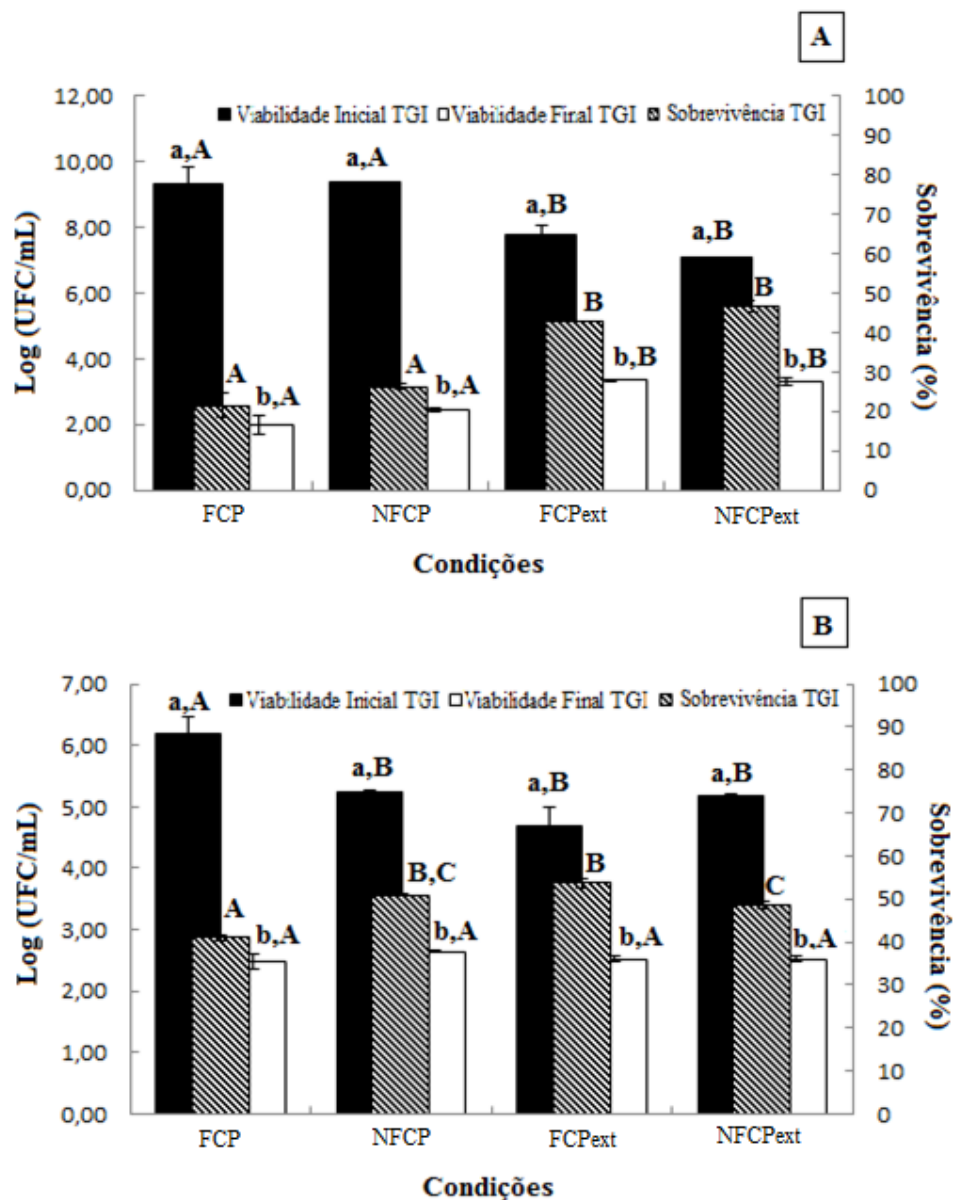


Figura 5.4 - Viabilidade inicial e final (Log UFC/mL) *L. rhamnosus* ATCC 7469 para o Teste Gastrointestinal (TGI) no início do estoque (A) e no final do estoque (B) do período de cada condição (Fermentado com pectina comercial (FCP), Não fermentado com pectina comercial (NFCP), Fermentado com pectina extraída (FCPext) e Não fermentado com pectina extraída (NFCPext)) e seus respectivos índices de sobrevivência (%). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre a viabilidade inicial e final do TGI para cada grupo; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes grupos.

No início do estoque das bebidas FCP e NFCP as sobrevivências foram 21,51 % (Viabilidade Inicial: 9,30 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2 Log UFC/mL) e 26,30 % (Viabilidade Inicial: 9,36 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2,46 Log UFC/mL). Por sua vez, as condições contendo pectina extraída apresentaram maior sobrevivência para as células de *L. rhamnosus* ATCC 7469, 42,83 % (Viabilidade Inicial: 7,8 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 3,34 Log UFC/mL) para FCPext e 46,75 % (Viabilidade Inicial: 7,06 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 3,30 Log UFC/mL) para NFCPext. Para o período final do estoque, em todas as condições, *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresentou-se mais resistente ao teste de simulação gastrointestinal, não havendo diferença estatística entre suas viabilidades finais.

No entanto, os índices de sobrevivência variaram de acordo com as condições, sendo essas de 40,93 % (Viabilidade Inicial: 6,19 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2,49 Log UFC/mL) para FCP, 50,93 % (Viabilidade Inicial: 5,23 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2,64 Log UFC/mL) para NFCP, 53,59 % (Viabilidade Inicial: 4,70 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2,52 Log UFC/mL) para FCPext e (Viabilidade Inicial: 5,18 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2,52 Log UFC/mL) 48,65 % para NFCPext. O aumento nos índices de sobrevivência deve estar relacionado à adaptação do micro-organismo, durante o período de estoque, ao baixo pH da bebida, tornando assim a linhagem mais tolerante ao pH gástrico (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Os valores médios de pH e a concentração de ácido lático são apresentados na Figura 5.5. A bebida fermentada e com pectina comercial (FCP) apresentou redução significativa em seu pH (3,40 - 3,30), o que pode estar relacionado ao aumento da concentração de ácido lático durante o período de estoque (1,08 g/L - 1,23 g/L). Este comportamento também foi observado para a bebida não fermentada e com pectina comercial (NFCP), o qual, por não ser fermentado, não apresentou ácido lático no início do estoque, porém, a presença de carboidratos (glicose, frutose e sacarose) possibilitou a produção desse ácido por *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o período de 56 dias (1,35 g/L). No caso da bebida fermentada e com pectina extraída (FCPext), seu pH se manteve estável durante os 28 dias de estoque assim como a concentração de ácido lático (1,28 g/L). Por sua vez, para a bebida NFCPext, o pH se manteve estável e o micro-organismo não foi capaz de produzir ácido lático durante o período de estoque, provavelmente devido ao menor tempo de avaliação (28 dias), em relação ao tempo do estoque da bebida não fermentada contendo a pectina comercial.

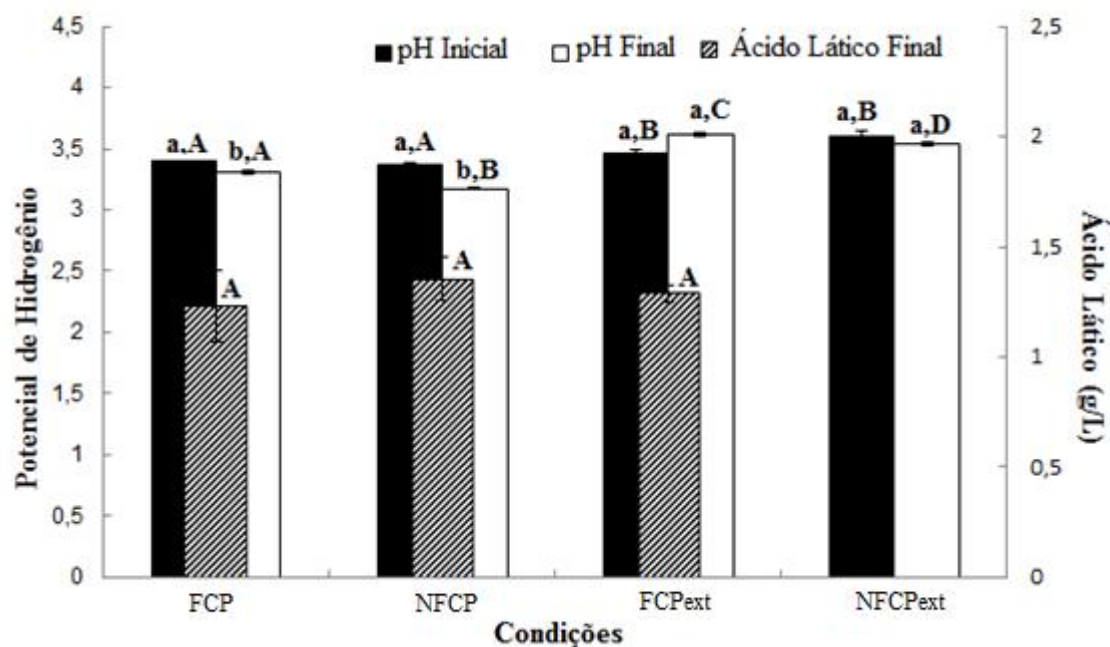


Figura 5.5 – Perfil do pH em cada bebida (Fermentado com pectina comercial (FCP), Não fermentado com pectina comercial (NFCP), Fermentado com pectina extraída (FCPext) e Não fermentado com pectina extraída (NFCPext) e concentração de ácido láctico correspondente ao período final de estoque. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre o pH inicial e final para cada condição; Diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre as diferentes condições.

A concentração final de ácido láctico não apresentou diferença significativa nas bebidas FCP, NFCP e FCPext, sendo inferior ao observado por Farias et al. (2016), o qual obtiveram 6 g/L de ácido láctico para bebida probiótica desenvolvida com esse mesmo micro-organismo e espécie de Maracujá. Essa diferença na quantidade de ácido láctico produzido deve-se ao fato da fermentação das bebidas no presente trabalho terem sido realizadas em $\text{pH } 3,5 \pm 2$, diferentemente de Farias et al. (2016) que realizaram a fermentação no pH ótimo para *L. rhamnosus* ATCC 7469 (pH 6,00). Tradicionalmente o ácido láctico é considerado agente antimicrobiano (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010), sendo sua presença fundamental para impedir a contaminação do produto durante o período de estocagem (PIMENTEL *et al.*, 2015). Com base nisso, deve-se observar que a bebida contendo pectina extraída (NFCPext)

está mais susceptível a contaminação por agentes microbianos em virtude da ausência do ácido láctico.

Além da determinação do ácido láctico, foi realizada a quantificação do ácido cítrico, já que, devido a sua ação como agente acidulante, altas concentrações do mesmo diminuem a necessidade de adição de acidificantes nos produtos (FARIAS *et al.*, 2016). As bebidas com pectina comercial detiveram menor concentração de ácido cítrico (FCP = $0,75 \pm 0,11$ g/L; NFCP = $0,81 \pm 0,05$ g/L). Por sua vez, as bebidas com pectina extraída apresentaram maiores concentrações (FCPext = $2,06 \pm 0,3$ g/L, NFCPext = $2,10 \pm 0,10$ g/L), devido à presença desse composto na pectina da farinha da casca do Maracujá da Caatinga, decorrente da etapa de extração. Isto promove a maior concentração e menor necessidade para adição de acidificantes.

Na Figura 5.6 observam-se as concentrações médias de sacarose no início e no final do estoque das bebidas e seus consumos.

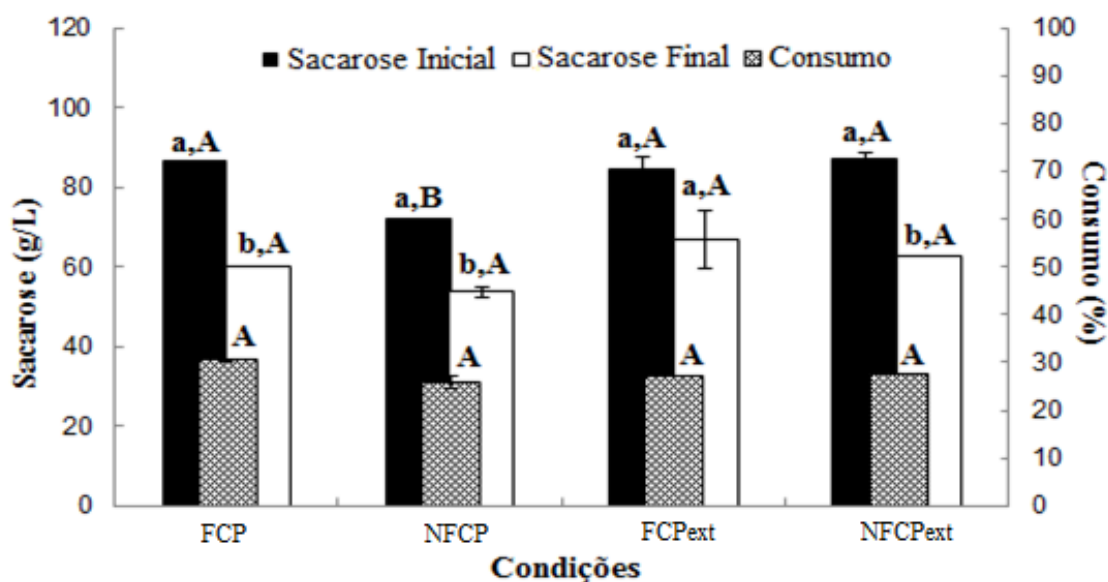


Figura 5.6 - Concentrações iniciais e finais de sacarose (g/L) e seu respectivo consumo por *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o período de estoque refrigerado (4 °C) para as quatro condições: (FCP) Fermentado com pectina comercial, (NFCP) Não fermentado com pectina comercial, (FCPext) Fermentado com pectina extraída e (NFCPext) Não fermentado com pectina extraída. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) para a

sacarose durante o tempo (inicial e final) na mesma condição; Diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($P \leq 0,05$) durante o tempo para as diferentes condições.

O consumo de sacarose não apresentou diferença significativa com redução média em suas concentrações de 27,39 % para as quatro bebidas funcionais. As concentrações de sacarose alcançaram os valores 60,18 g/L e 53,63 g/L, para FCP e NFCP aos 56 dias de estoque e 66,71 g/L e 62,93 g/L para FCPext e NFCPext aos 28 dias de estoque.

CONCLUSÕES

- A farinha da casca do Maracujá da Caatinga se mostrou uma fonte barata e acessível para a extração de pectina de baixo grau de esterificação quando associado às condições de extração utilizadas no presente trabalho, sendo necessárias condições adequadas para formação de gel por esse tipo de pectina, como formação de íons de Cálcio, o que não foi observado no presente estudo;
- A vantagem na utilização de pectinas com baixo grau de esterificação, assim como a obtida da farinha da Casca do Maracujá da Caatinga, para o desenvolvimento de bebidas funcionais consiste na maior rapidez com que essas são fermentadas em detrimento do menor número de metilações existentes em sua estrutura, tendo assim efeito mais rápido do que as de algo grau de esterificação;
- *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 não foi capaz de consumir pectina. Dessa maneira, a associação desse micro-organismo com pectina não apresenta capacidade de originar cultura simbiótica. Ou seja, a pectina adicionada à bebida contendo *L. rhamnosus* ATCC 7469 provavelmente será fermentada no intestino, contribuindo assim com o crescimento das bactérias benéficas existentes nessa região.
- A adição de sacarose nas bebidas probióticas não fermentadas melhorou a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais, diferentemente do observado para a bebida fermentada. Porém, independente da fermentação a adição de pectina extraída potencializa a sobrevivência do micro-organismo. Ou seja, as bebidas probióticas contendo esses componentes valorizam o Maracujá da Caatinga pela utilização da pectina extraída e podem ter maiores índices de aceitabilidade devido à presença de sacarose.
- A fermentação não influenciou a sobrevivência do micro-organismo na simulação das condições gastrointestinais, antes e após estoque refrigerado. Por sua vez, a pectina extraída pode ser utilizada tanto para bebida probiótica fermentada quanto não fermentada, com estoque de 28 dias.
- A concentração de ácido láctico permaneceu constante nas bebidas fermentadas durante 28 dias de estoque, permitindo que essas fossem consideradas mais

estáveis do que as não fermentadas. Por outro lado, o fato do consumo de sacarose não ter apresentado diferença significativa permitiu que as quatro bebidas probióticas apresentassem o mesmo teor calórico.

- A bebida fermentada contendo a pectina extraída (FPext) apresentou um maior potencial para o consumo devido à maior sobrevivência do micro-organismo nas condições simuladas do trato gastrointestinal no final do período de estoque, além de conter ácido lático, que é um agente antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acessado em: 02 de junho de 2016.

AL-SHERAJI, S. H., ISMAIL, A., MANAP, M. Y., MUSTAFA, S., YOSUF, R. M. and Hassan, F. A. Prebiotic as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1542 - 1553, 2013.

ALVES, N.N.; MESSAOUD , G.B.; ST_EPHANE DESOBRY, S. et al. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 45 – 54, 2016.

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

AMORIM, F.L.; SILVEIRA, P.T. DE S.; SILVA, G.V.; CAFIEIRO, C.S.P. Elaboração e aceitação sensorial de licor Maracuja-do-Mato com diferentes tipos de calda. **Revista de Desenvolvimento e Inovação**, v. 1, n. 1, p.88-91. 2013.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Method 991.14 Coliform and *Escherichia coli* Counts in Food**. 2002.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Method 999.09 Vip for *Salmonella* for the Detection of Motile and Non-Motile *Salmonella* in All foods.** 2002.

ARAÚJO, A. J. B; AZEVÊDO, L. C.; COSTA, F. F. P.; AZOUBEL, P. M. **Caracterização físico-química da polpa de maracujá do mato.** In: VI ENAAL – Encontro Nacional e II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos, 2009.

ARAÚJO, F.P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no Semi-Árido brasileiro.** Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2007.

ARAÚJO, F.P.; KIILL, L.H.P.; SIQUEIRA, K.M.M. **Maracujá do mato: alternativa agroindustrial para o Semi-Árido.** Embrapa CPATSA, Petrolina, 2006.

ARAÚJO, F.P.; SILVA N. da; QUEIROZ M.A. de. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 723-730, 2008.

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

BARCELLOS, M.D. de. **O processo decisório de compra de alimentos funcionais: uma pesquisa sobre as motivações, atitudes e intenções de consumo no Brasil.** Projeto Universal (CNPQ), Porto Alegre, 2009.

BELUOMINI, M.A. **Detecção eletroquímica de ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em técnica de HPLC**. Araraquara, 2013.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V. et al. *Passiflora edulis* Sims: A maneira taxonômica correta de citar o maracujá amarelo (e de outras cores). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 566 - 576, 2008.

BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A.; BAKKER, Y.V. *Passiflora L.*; In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **RiMa/FAPESP**. v.3, p.248 - 274, 2003.

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

BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; CORBO, M.R. et al. Suitability of *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus plantarum* as Probiotics Intended for Fruit Juices Containing Citrus Extracts. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, p. M1764 - M1771, 2013.

BINNS N; HOWLETT J. Functional foods in Europe: international developments in Science and health claims. **European Journal of Nutrition**, v.48, p. 3-13, 2009.

BLANDINO, A.; AL-ASEERI M.E., PANDIELLA S.S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, v. 36, v. 6, p. 527 - 543, 2003.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, p. 231, 1989.

BOCHEK, A.M.; ZABIVALOVA, N.M.; PETROPAVLOVSKII G.A. Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, pp. 796 - 799, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S. Composição polissacarídica: Estrutura da parede celular e fibra alimentar. In: Lajoto, F.M. et al. **Fibra dietética em Iberoamérica: tecnologia y salud: obtencion, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos**. São Paulo, Varela, p.43 – 60, 2001.

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

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 Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373 - 380, 2007.

CALLIARI, C.M. **Extração Térmica, química e Enzimática de pectina do Bagaço da Laranja**. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

CAMPOS, A.V.S. **Características físico-químicas e composição mineral da polpa de *Passiflora setacea***. Brasília. 2010.

CAMPOS, F.G.C.M. de.; HABR-GAMA, A.; PLOPPER, C.et al. ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E DOENÇAS COLORRETAIS. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. v. 19, n.1, p. 1 - 6, 1999.

CANTERI M.H.G. LIRIAN MORENO, GILVAN WOSIACKI; AGNES DE P. SCHEER. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149 - 157, 2012.

CANTERI-SCHEMIN, M. H.; FERTONANI, H.C.R.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Extraction of pectin from apple pomace. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 259–266, 2005.

CANUTO, G.A.B.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M. de T. Caracterização Físico-Química de Polpas de Frutos da Amazônia e sua Correlação com a Atividade Anti-Radical Livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196 - 1205, 2010.

CASTRO, J.Á.; NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Definition of morpho agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 145, p. 17 – 22, 2012.

CEAPA, C.; LAMBERT, J.; LIMPT, K.V.; WELS, M. et al. Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Signatures Determined by Phenotype Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5458 – 5470, 2015.

CEAPA, C.; WOPEREIS, H.; REZAÏKI, L. ET AL. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, p.139 – 155, 2013.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, A.P.; CORRÊA, R.X. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, p. 261 - 270, 2014.

CERVI, A.C. **Passifloraceae do Brasil. estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora***. Madrid: Fontqueira XLV, 1997. 92 p.

CHAMPAGNE, C.P. et al. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**, v. 42, p. 612 - 621, 2009.

CHAMPAGNE, C.P; GARDNER, N.J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastrointestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 539 - 543, 2008.

CHANG, C.P.; LIEW, S.L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 536-543, 2013.

COELHO, M.T. **Pectina: Características e Aplicações em Alimentos**. Pelotas, p. 1 - 33, 2008.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**. v. 226, n.5, p. 1065 - 1073, 2008.

CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.M.; HAMINIUK, C.W.I., et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (*Passion fruit*). **Trends in Food Science & Technology**, p. 1- 44, 2016.

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

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**. São Paulo, Piracicaba, 2006, p. 65.

CRUCHET, S.; FURNES R.; MARUY, A. et al. The Use of Probiotics in Pediatric Gastroenterology: A Review of the Literature and Recommendations by Latin-American Experts. **Pediatric Drugs**, v. 17, n. 3, p. 199 - 216, 2015.

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

DERIVI, S.C.N.; MENDEZ, M.H.M.; FRANCISCONI, A.D. et al. Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena*, L.) em ratos. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 164 - 169, 2002.

DONGOWSKI G.; LORENZ, A.; PROLL, J. The Degree of Methylation Influences the Degradation of Pectin in the Intestinal Tract of Rats and In Vitro. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1935 - 1944, 2002.

DORON, S.; SNYDMAN D.R.; GORBACH S.L. Lactobacillus GG: Bacteriology and Clinical Applications. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 34, n. 3, p. 483 - 498, 2005.

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

EMBRAPA. **Embrapa lança primeira variedade de maracujá da Caatinga para cultivo comercial**. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/noticia/13304501/embrapa-lanca-primeira-variedade-de-maracuja-da-caatinga-para-cultivo-comercial>>. Acesso em: 09 de Agosto de 2016.

Empresa Brasil de comunicação (EBC). **Cerca de 40 % da população brasileira têm intolerância à lactose**. 2013. Disponível em: <<http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2013-05-30/cerca-de-40-da-populacao-brasileira-tem-intolerancia-lactose>>. Acessado em: 03 de fevereiro de 2017.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J. de. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro – histórico e Perspectivas. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, p. 1 - 36, 2011.

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**, v. 71, p. 149 - 154, 2016.

FARIAS, N.V. de M. **Crescimento e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em suco de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*)**. Recife, 2016.

FERTONANI, H.C.R. **Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã**. Ponta Grossa, 2005.

FISSORE, E.N.; DOMINGO, C.S.; GERSCHENSON, L.N.; GIANNUZZI, L. A study of the effect of dietary fiber fractions obtained from artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. scolymus) on the growth of intestinal bacteria associated with health. **Food & Function**, v. 6, p. 1667 - 1674, 2015.

FLINT, H.J.; DUNCAN, S.H.; SCOTT, K.P.; LOUIS, P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1101 - 1111, 2007.

FONTELES, T.V.; COSTA, M.G.; DE JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2819-2826, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Report on Functional Foods**. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/nutrition/en/>>. Acesso em: 28 de junho de 2016.

FOOD INGREDIENTS BRASIL a. **PECTINAS PROPRIEDADES E APLIAÇÕES**. Nº 29, 2014.

FOOD INGREDIENTS BRASIL b. **APLICAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**. Nº 30, 2014.

GÓMEZ, B.; GULLÓN, B.; YÁÑEZ, R. et al. Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p.108 - 121, 2016.

GRAMKOW, C.A. Comércio Exterior Ltda. **FOOD INGREDIENTS BRASIL ALIMENTOS FUNCIONAIS E SUAS PERSPECTIVAS NO MERCADO BRASILEIRO**. v. 30, 2014.

GRONDE, T.V. DE.; HARTOG A.; HEES C. V. et al. Systematic review of the mechanisms and evidence behind the hypocholesterolaemic effects of HPMC, pectin and chitosan in animal trials. **Food Chemistry**, v. 199, p. 746 - 759, 2016.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 104 - 119, 2008.

HEENAN, C.N. et al. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a non fermented frozen vegetarian dessert. **LWT- Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p.461 - 466, 2004.

HIGAREDA, R.A. et al. Commercial pectin concentrate from hawthorn pulp. **Revista Chapingo, Serie Horticultura**, v.1, n. 4, p.155 - 157, 1995.

HOJSAK, I.; ABDOVIĆ, S.; SZAJEWSKA H. et al. Lactobacillus GG in the Prevention of Nosocomial Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections. **Pediatrics**, v. 125, p. 1171 - 1177, 2010.

IGLESIAS M.J. Presente y futuro de los alimentos funcionales. In: Inglesias MJ; Alejandre AP (Coord.). Alimentos saludables y de diseño específico. Alimentos funcionales. 1ª ed. Madrid: Ed. IM&C, 2010, p. 29-44.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS**. IV Edição, 1º Edição Digital, 2008, 1020 p.

JORJÃO, A.L.; OLIVEIRA, F.E. DE.; LEÃO, M.V.P. et al. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. **The ScientificWorld Journal**, p. 6, 2015.

JUNIOR, W.E.F. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. **Química Nova na Escola**, n. 29, p. 8 – 13, 2008.

KIILL, L.H.P.; SIQUEIRA, K.M.M. DE.; ARAÚJO, F.P. de et al. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina(Pernambuco, Brazil). **Oecologia Australis**, v.14, n. 1, p.115-127, 2010.

KILLIP, E.P. The American species of Passifloraceae. Publications of the Field Museum of Natural History. **Botanical Series**, v. 19, p. 1 - 613, 1938.

KLIEMANN, E.; SIMANS, K.N. de.; AMANTE, E.R et al. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 476 - 483, 2009.

KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, A.; JADRANKA GORETA, J.; MATOČIĆ, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, p. 121-127, 2000.

KULKARNI, S.G.; VIJAYANAND, P. Efeito das condições de extração sobre as características de qualidade da pectina da casca de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. Flavicarpa L.). **LWT - Food Science & Technology**, v. 43, p. 1026 - 1031, 2010.

LAUFENBERG, G.; KUNZ B.; NYSTROEM M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167 - 198, 2003.

LIEW, S.Q.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A. Extraction and characterization of pectin from passion fruit peels. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 231 - 236, 2014.

LIEW, S.L.; ARIFF A.B.; RAHA A.R.; HO Y.W. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p.137 - 142, 2005.

LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, p. 396, 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**,v. 47 ,p. 315 - 323, 2006.

MACFARLANE S.; MACFARLANE G.T.; CUMMINGS J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, p. 701- 714, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160 p.

MARTINS, E.M.F.; RAMOS, A.M.; VANZELA, E.S.L. et al. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764 - 770, 2013.

MATTES, F. **Cholesterol and the Power of Pectin**. 2009. Disponível em: <http://www.herbstreith-fox.de/fileadmin/tmpl/pdf/awtinfo/AWT_Cholesterol_and_the_Power_of_Pectin.pdf>. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.

MELETTI, L.M.M.; BRÜCKNER, C.H. Melhoramento Genético. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa Nº 01**. 2000.

MINJARES-FUENTES, R.; FEMENIA, A.; GARAU, M.C. et al. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 179 - 189, 2014.

MIRA, G.S.; GRAF H.; CÂNDIDO, L.M.B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em betaglucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 11 - 20, 2009.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28 - 41, 2014.

MOORTHY, I.G.; MARANB, J.P.; SURYAA, S.M. et al. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1323 – 1328, 2015.

MORTON J. **Passion fruit**. 1987. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/Passionfruit.html>> . Acesso em: 26 de Janeiro de 2018.

MOUSAVI, Z.E.; MOUSAVI, M.; RAZAVI, S.H.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 123 - 128, 2011.

NAMBUDIRI, E.S.; SHIVASHANKAR, S. Cocoa waste and its utilization. **Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal**, v.8, n.3, p.78 - 80, 1985.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; NICOLAUS, B. et al. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, v. 18, p. 280 - 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**, v. 21, p. 49-53, 2016.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas**, v.1, n.1, p. 33-46, 2001.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.X. de.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. et al. SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora cincinnata* MAST.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 584 - 590, 2010.

OLIVEIRA, D.A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S.R.S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55 - 62, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO /ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (FAO/OMS). **Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación**. Roma, 2006.

PAGÁN, J.; IBARZ A.; LLORCA, M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. **Food Research International**, v. 34, p. 605-612, 2001.

PARKAR, S.G.; EMMA L. REDGATE, E.L.; WIBISONO, R. et al. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 2010 - 218, 2010.

PEREIRA, A. D.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of ‘somnus’ passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p.12 - 21, 2015.

PEREIRA, A.L.F.; MACIEL, T.C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, p. 1276 - 1283, 2011.

PERES, C.M.; PERES, C.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F.X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid

bacteriad with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, p. 31 - 42, 2012.

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**, v. 63, p. 415 - 422, 2015.

PINHEIRO E. R. **Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa): Otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química**. Florianópolis, 2007.

PINHEIRO, E.R.; SILVA, I.M.D.A.; GONZAGA, L.V. et al. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5561 - 5566, 2008.

PITA, J. da S.L. **Caracterização Físico-Química e Nutricional da Polpa e Farinha da Casca de Maracujazeiros do Mato e Amarelo**. Itapetinga, Bahia, 2012.

RAKIN, M.; VUKASINOVIC, M.; SILER-MARINKOVIC, S.; MAKSIMOVIC, M. Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juice enriched with brewer's yeast autolysate. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 599 - 602, 2007.

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

RAPPOSCH, S.; ELISKASES-LECHNER F.; GINZINGER, W. Growth of Facultatively Heterofermentative Lactobacilli on Starter Cell Suspensions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5597 - 5599, 1999.

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

ROBERFROID M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34 (Suppl. 2), p. 105 - 110, 2002.

ROBERFROID M. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 830 - 837, 2007.

ROMERO-RODRIGUEZ M.A.; VAZQUEZ-ODERIZ M.L.; LOPEZ- HERNANDEZ J.; SIMAL-LOZANO J. Composition of babaco, feijoa, passion-fruit and tamarillo produced in Galicia (NW Spain). **Food Chemistry**, v. 49, p. 23 - 27, 1994.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01 - 16, 2006.

SAITO, H.; WATANABE, T.; TADO, O. Protective effects of lactobacilli on experimental Escherichia coli infection. **Medicine and Biology**, v. 101, p. 61- 64, 1980.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase, production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213 - 294, 1993.

SANDERS, M.; HUIS IN'T VELD, J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 293-315, 1999.

SANTOS, E.K.R dos; AZOUBEL; P.M., GOUVEIA, E.R. Better Pectin Yield From Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): From Shaker or Ultrasound? A Comparison. **Waste Biomass Valor**, p. 1-6, 2016.

SANTOS, E.K.R. dos. **Avaliação da Capacidade de Extração de Pectina da Casca do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em Mesa Agitadora e Ultrassom Associada à Ação de Ácido Cítrico**. Recife, 2015.

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli in novel-type probiotic mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 79 - 87, 1999.

SEGERS, M.E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 57. 2014.

SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R. B. et al. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 186 - 192, 2014.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli, **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130 - 135, 1960.

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. Assessing the Acid Tolerance and the Technological robustness of Probiotic Cultures for Fortification in Fruit Juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 8, p. 279 - 284, 2007.

SILVA, A.C.C.; SILVA, N.A. da.; PEREIRA, M.C.S.; VASSIMON, H.S. Foods containing functional ingredients in its formulation are healthy? A review of article published in brazilian journals. **Revista Conexão Ciência**, v. 11, p. 133 – 144, 2016.

SOUZA, A.A.; RODRIGUES, L.S.; ARAÚJO, A.J.B. et al. **Elaboração, Aceitabilidade e Intenção de Compra de Iogurte Saborizado com Polpa de Maracujá do Mato**. VIII CONNEPI, SALVADOR, 2013.

SRIRANGARAJAN, A.N; SHRIKHADE, A.J. Mango peel waste as a source of pectin. **Current science**, v. 45, n.17, p. 620 - 621, 1976.

STRINGUETA P.C.; AMARAL M.P.H.; BRUMANO L.P. et al. **Public Health Policies and Funcional Property Claims for Food in Brazil Structure and Function of Food Engineering**. Croatia, 2012, p. 307-336.

SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 129 - 137, 2005.

THAKUR, B.R.; SINGH R.K.; HANDA A.K. Chemistry and uses of pectin – a reviews. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.

TONEL, I.S.P.A. **Efeito da Utilização de Butirato de Sódio na Digestibilidade, Atividade Fermentativa e Morfologia Intestinal de Leitões Desmamados**. Lisboa, 2009.

VAN DEUN, K.; PASMANS, F.; VAN IMMERSEEL, F. et al. Butyrate protects Caco-2 cells from Campylobacter jejuni invasion and translocation. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 480 - 484, 2008.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n.1, p. 6 - 21, 2015.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p. 895 - 904, 2003.

VIRK, B.S.; SOGI, D.S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace (Malus Pumila Cv Amri) peel waste. **International Journal of Food Properties**, v. 7, p.1 - 11, 2004.

VORAGEN, A.G.J.; COENEN, GJ.; VERHOEF, R.P. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263, 2009.

WIDMER, W.; MONTANARI, A.M. **Citrus waste streams as a source of phytochemicals**. In: 107th Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society, Orlando/Florida, USA, v. 107, p. 284 - 288, 1995.

XU, Y.; ZHANG, L.; BAILINA, Y. et al. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 72 – 81, 2014.

YAPO, B.D. Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3147 - 3151, 2009.