

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

NATALIE VERÍSSIMO DE MIRANDA FARIAS

**Crescimento e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC
7469 em suco de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*)**

RECIFE

2016

NATALIE VERÍSSIMO DE MIRANDA FARIAS

**Crescimento e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus*
ATCC 7469 em suco de Maracujá da Caatinga (*Passiflora
cincinnata*)**

Dissertação apresentada 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. Dr.^a Ester
Ribeiro Gouveia

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Farias, Natalie Veríssimo de Miranda

Crescimento e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em suco de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*)/Natalie Veríssimo de Miranda Farias. – Recife: O Autor, 2016.

73 f.: il.

·
Orientador: Ester Ribeiro Gouveia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Probióticos 2. Lactobacilos I. Gouveia, Ester Ribeiro (orient.)II. Título.

579.37

CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2016-186

NATALIE VERÍSSIMO DE MIRANDA FARIAS

Crescimento e sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em suco de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*)

Dissertação apresentada 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. Dr.^a Ester Ribeiro Gouveia

Aprovada em: 29/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ester Ribeiro Gouveia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 29 de fevereiro de 2016.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus por me iluminar.

À minha família, pelo apoio e exemplo de força e garra para ultrapassar difíceis barreiras.

À minha orientadora Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia, por vir me guiando neste trabalho, com paciência e dedicação.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LabBio) Mari, Bárbara, Suzy, Káren, Raissa, Mayara, Eloyza e Caio, por fazerem do laboratório um ambiente de trabalho mais alegre, e por sempre me ajudarem.

Às minhas chefes no trabalho (LACEN/PE), Lúcia Francelino e Lúcia Filizola por sempre me apoiarem, e me incentivarem durante o mestrado.

Ao Departamento de Antibióticos e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial.

Às professoras participantes da banca avaliadora pela presença e contribuições para este trabalho.

*"Saber muito não lhe torna inteligente.
A inteligência se traduz na forma como você recolhe,
julga, maneja e, sobretudo, onde e
como aplica uma informação."*

Carl Sagan

RESUMO

No presente estudo foram realizados experimentos para avaliar o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* em suco do Maracujá da Caatinga, bem como sua resistência a diferentes fatores físico-químicos. Foi realizada a caracterização da polpa do maracujá quanto aos teores de açúcares, pH e ácidos orgânicos (cítrico e málico). Inicialmente, foram investigados tanto a concentração de inóculo (0,1%, 1,0% e 5% V/V), quanto a temperatura (30°C, 33,5°C e 37°C), para um maior crescimento do micro-organismo. Na segunda etapa do trabalho, foi aplicado um planejamento composto central rotacional (DCCR), variando as concentrações do inóculo e da polpa do maracujá, cujos níveis foram 0,5%, 1,5% e 2,5% V/V, e 5%, 10% e 15% V/V, respectivamente. As respostas avaliadas foram a relação entre a viabilidade e o pH finais da fermentação, bem como a concentração de ácido láctico. Foram realizados estudos cinéticos sobre a viabilidade do *L. rhamnosus* utilizando as melhores concentrações de inóculo e de polpa, selecionadas no DCCR, durante a fermentação e estoque refrigerado. A sobrevivência da linhagem sob as condições de estresse gastrointestinal também foi avaliada durante o estoque. A polpa continha 50 g.L⁻¹ ART, 46 g.L⁻¹ de ácido cítrico e 9 g.L⁻¹ de ácido málico. Nos ensaios preliminares, os melhores resultados foram obtidos no experimento com 1% V/V de inóculo e a 37°C. As melhores condições de crescimento obtidas nos experimentos do DCCR foram 2,91% V/V de inóculo e 14,45% V/V de polpa. Durante o estoque refrigerado não houve mudança significativa na viabilidade de *L. rhamnosus*, mantendo em 9 Log (UFC.mL⁻¹), mesmo após a simulação das condições gastrointestinais.

Palavras-chave: Viabilidade, simulação gastrointestinal, validação, estoque.

ABSTRACT

In the present study, several tests were performed to evaluate *Lactobacillus rhamnosus* growth in passion fruit from Caatinga juice, as well as to study their resistance to physicochemical factors. The pulp was characterized as to its sugar content, pH and organic acids concentration (citric and malic). Initially, inoculums concentration (0.1%, 1.0%, 5% V/V) as well as temperature (30°C, 33.5°C, 37°C) investigation was performed, to obtain a significant growth of the microorganism. As second step, a central composite rotational design (CCRD) was applied, using different inoculums and pulp of passion fruit concentration, with initial levels 0.5%, 1.5%, 2.5% V/V, and 5%, 10%, 15% V/V, respectively. Two responses were obtained, one for the relation between final viability and final pH, and the other one for lactic acid concentration. Kinetics studies on viability of the *L. rhamnosus* were performed using the best concentrations of pulp and inoculums, selected on CCRD, during fermentation and refrigerated storage. The lineage survival under gastrointestinal stress conditions was evaluated during storage. It was found that the pulp had 50 g.L⁻¹ TRS, 46 g.L⁻¹ of citric acid and 9 g.L⁻¹ of malic acid. At the preliminary assays the best results were obtained in the experiment with 1% inoculums and 37 °C. The best growth conditions obtained with the CCRD were 2.91% V/V inoculums and 14.45% V/V passion fruit pulp. During refrigerated storage, there was no significant change on the viability of *L. rhamnosus*, sustained in 9 Log UFC.mL⁻¹, even after gastrointestinal stress simulation.

Key-words: Viability, gastrointestinal simulation, validation, storage.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Produtos Probióticos.....	16
3.1.1 Benefícios.....	18
3.1.2 Sucos de frutas como veículos para probióticos.....	20
3.2 Resistência dos Probióticos– Processamento, Estoque e Trato Gastrointestinal.....	22
3.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	23
3.4 Maracujá-da-Caatinga (<i>Passiflora cincinnata</i>).....	24
3.5 Método de Superfície de Resposta com Planejamento por Delineamento Composto Central Rotacional.....	26
3.6 Validação de Metodologias Analíticas.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Micro-organismo.....	32
4.2 Obtenção e Processamento do Maracujá da Caatinga (<i>P. Cincinnata</i>).....	32
4.3 Inóculo e Fermentação.....	33
4.4 Quantificação dos açúcares.....	33
4.5 Quantificação da Viabilidade Celular e Determinação do pH.....	33
4.6 Caracterização Físico-química da Polpa do Maracujá da Caatinga.....	34
4.7 Validação da Metodologia para Quantificação Simultânea dos Ácidos Cítrico, Ascórbico, Málico e Lático.....	34
4.7.1 Reagentes utilizados.....	34
4.7.2 Condições cromatográficas.....	34
4.7.3 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos.....	34
4.7.4 Validação do método.....	35

4.7.5 Aplicação do método.....	35
4.8 Ensaios Preliminares.....	35
4.9 Delineamento Composto Central Rotacional.....	36
4.9.1 Condições de fermentação.....	37
4.10 Validação do Modelo Polinomial.....	37
4.11 Análise do Estoque.....	37
4.12 Sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> sob simulação gastrointestinal.....	37
4.13 Análise Estatística.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Caracterização Físico-química da Polpa do Maracujá da Caatinga.....	39
5.2 Validação da Metodologia para Quantificação Simultânea dos Ácidos Cítrico, Ascórbico, Málico e Lático.....	40
5.2.1 Especificidade e Seletividade.....	40
5.2.2 Robustez.....	43
5.2.3 Linearidade.....	44
5.2.4 Precisão.....	44
5.2.5 Exatidão.....	45
5.2.6 Análise dos Fermentados.....	46
5.3 Efeito do Tamanho do Inóculo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 na Fermentação de Suco do Maracujá da Caatinga.....	46
5.4 Realização do Planejamento Composto Central Rotacional.....	49
5.5 Estudo Cinético Usando as Melhores Condições Preditas pelo DCCR para uma Maior RVpH.....	56
5.6 Análise de Estoque e Sobrevivência a Simulação das Condições Gastrointestinais.....	58
6 CONCLUSÕES.....	61
7 REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Benefícios da ingestão de probióticos.....	20
FIGURA 3.2	Maracujá da Caatinga (<i>P. cincinnata</i>).....	25
FIGURA 5.1	Cromatograma obtido da mistura dos padrões.....	40
FIGURA 5.2	Cromatogramas da polpa e do fermentado: ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico.....	40
FIGURA 5.3	Espectros eletromagnéticos dos padrões e das amostras: ácido cítrico na polpa e no fermentado (A); ácido málico na polpa e no fermentado (B); ácido láctico (C).....	42
FIGURA 5.4	Queda do pH, viabilidade <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 (Log UFC/mL), taxa de crescimento (%) e concentração ART, na fermentação com três diferentes concentrações de inóculo, empregando-se 10% (V/V) de polpa a 30°C por 12h.....	47
FIGURA 5.5	Queda do pH, viabilidade <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 (Log UFC/mL), taxa de crescimento (%) e concentração ácido láctico com três diferentes temperaturas e empregando-se 10% (V/V) de polpa e 1% (V/V) de inóculo por 12h.....	48
FIGURA 5.6	Viabilidade do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 (Log UFC.mL ⁻¹), concentração de ART, valor de pH e concentração de ácido láctico após as fermentações nas condições do DCCR.....	50
FIGURA 5.7	Superfície de resposta obtida para a RVpH em função das concentrações de polpa e de inóculo utilizadas nas fermentações do suco realizadas pelo <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469.....	54
FIGURA 5.8	Superfície de resposta obtida para a concentração de ácido láctico em função das concentrações de polpa e de inóculo utilizadas nas fermentações do suco realizadas pelo <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469.....	55
FIGURA 5.9	Viabilidade do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 e concentração de ART durante a fermentação do suco.....	57
FIGURA 5.10	Concentração de ácidos orgânicos e pH durante a fermentação do suco.....	57
FIGURE 5.11	Sobrevivência de <i>L.rhamnosus</i> ATCC 7469, pH e concentração de ácido láctico no suco fermentado durante o estoque.....	59
FIGURA 5.12	Sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 com 28 dias de estoque após exposição de simulação gástrica <i>in vitro</i> (60 e 120 minutos) e entérica <i>in vitro</i> (240 minutos).....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Combinações entre os níveis codificados de um DCC com dois fatores A e B.....	27
TABELA 3.2	Parâmetros considerados em uma validação de metodologia.....	30
TABELA 4.1	Níveis do DCCR para as condições de fermentação.....	36
TABELA 5.1	Tempos de retenção dos ácidos, usados para o cálculo da resolução dos picos em dois fluxos distintos.....	43
TABELA 5.2	Coeficientes angular e de determinação das curvas de regressão obtidas para cada ácido orgânico e seus limites de quantificação e detecção.....	44
TABELA 5.3	Precisão (N = 7) e acurácia (N = 3) na determinação dos ácidos cítrico, málico e láctico nos padrões e nos fermentados.....	45
TABELA 5.4	Concentração dos ácidos cítrico, málico e láctico nos fermentados utilizados para a aplicação do método.....	46
TABELA 5.5	Modelo experimental do DCCR e as respostas obtidas.....	51
TABELA 5.6	Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático polinomial.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	-Análise de Variância
ANVISA	-Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	-Açúcar Redutor
ART	-Açúcar Redutor Total
ATCC	-American Type Culture Collection
BAL	-Bactérias Ácido-Láticas
CLAE	-Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CG	-Cromatografia a Gás
DAD	-Detector por Arranjo de Diodos
DCC	-Delineamento Composto Central
DCCR	-Delineamento Composto Central Rotacional
DNSA	-Ácido Dinitrosalicílico
DP	-Desvio Padrão
DPR	-Desvio Padrão Relativo
EMBRAPA	-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GL	-Graus de Liberdade
LabBio	-Laboratório de Bioprocessos e Biproductos
LD	-Limite de Detecção
LQ	-Limite de Quantificação
MQ	-Média Quadrática
MRS	-de Man, Rogosa & Sharpe
MSR	-Método de Superfície de Resposta
RVpH	-Relação entre Viabilidade e pH
SCG	-Simulação das Condições Gástricas
SCI	-Simulação das Condições Intestinais
SQ	-Somas Quadráticas
UFC	-Unidades Formadoras de Colônia
UFPE	-Universidade Federal de Pernambuco

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são assim chamados por proporcionarem o bem estar de quem os consome, e, além disso, são capazes de promover a saúde, através do tratamento de determinadas doenças, como a obesidade tipo II, doenças cardiovasculares e síndrome do intestino irritável. Sendo classificadas como alimentos funcionais, as bebidas probióticas podem ser produzidas a partir de diferentes substratos e diferentes culturas microbianas.

Apesar de ser mais comum encontrar bebidas probióticas lácteas, muito se tem estudado sobre o uso de substratos vegetais, incluindo sucos de frutas, como meio de fermentação. Os sucos de frutas são ricos em vitaminas e minerais, sendo ideais tanto para a fermentação, quanto para o seu consumo. Além disso, apresentam alguns ácidos importantes, como o cítrico, que funciona como acidulante, e o málico, por possuir características organolépticas.

Uma fruta que vem sendo pesquisada por ser resistente à seca e a pragas e doenças é o Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*), que possui um alto valor nutricional, sendo rica em vitamina C. Ainda assim, seu cultivo e seu consumo se encontram muito restritos a pequenos produtores e habitantes das regiões produtoras, já que a espécie *Passiflora edulis* é ainda a mais popular no comércio. Entretanto, alguns estudos sobre a espécie *P. cincinnata* foram realizados, com o objetivo de incentivar seu cultivo e, consequentemente, a economia das regiões com clima semiárido do Nordeste brasileiro. É uma fruta que pode ser usada para a elaboração de diferentes produtos como geléias e sucos, com baixo investimento no seu cultivo, já que a aplicação de defensivos agrícolas não se mostra necessária.

Existem alguns parâmetros que devem ser estudados, monitorados e controlados, para que uma fermentação em condições ótimas seja realizada, tais como concentração de açúcar, pH, temperatura e agitação. Outros fatores a serem considerados incluem a escolha dos substratos e o pré-tratamento dado aos principais ingredientes, como cereais, frutas, etc., para auxiliar o processo fermentativo. Além disso, para que os benefícios de uma linhagem probiótica sejam aproveitados pelo hospedeiro, é preciso que esta atinja a área alvo em um estado metabolicamente ativo e em quantidade suficiente. Para que isto ocorra, os micro-organismos precisam ultrapassar várias barreiras, como estresses físico-químicos, enzimáticos e microbianos. Para garantir, portanto, os benefícios decorrentes da ingestão de culturas probióticas, é de fundamental importância que seja realizado um estudo da tolerância do micro-organismo aos estresses esperados, por simulação em laboratório.

Quando um processo, e conseqüentemente seus resultados são desconhecidos, é preciso que haja um estudo preliminar, a fim de estabelecer as melhores condições para o desenvolvimento de um fenômeno em estudo, com o menor uso de recursos. No caso de bebidas probióticas, é preciso saber em que faixa irá se trabalhar, seja em pH, inóculo, temperatura, concentração de substrato, etc. Com o conhecimento de valores aproximados, é possível esquematizar um caminho analítico e um delineamento experimental para um bom tratamento e interpretação dos dados coletados. O delineamento composto central rotacional é uma ferramenta bastante útil para determinar os ensaios que resultaram nas melhores respostas de um experimento, e, além disso, possibilita a construção de uma curva ou superfície para a determinação de um ponto ótimo dentro do intervalo de interesse.

Sendo assim, o presente estudo teve como principal foco a avaliação da sobrevivência e do crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* em suco de maracujá da Caatinga. Para isto foram avaliadas diferentes condições de fermentação, estudando-se a viabilidade da cultura probiótica e os produtos da fermentação.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar o crescimento e a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em suco do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*), visando a elaboração de um produto probiótico.

Específicos

- Validar o método de quantificação de ácidos orgânicos (citríco, málico, ascórbico e láctico) por cromatografia a líquido de alta eficiência;
- Caracterizar o suco do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*), quanto aos teores de carboidratos, nitrogênio e ácidos orgânicos;
- Selecionar as melhores condições de concentração de inóculo e de temperatura para o crescimento de *L. rhamnosus*;
- Aplicar um planejamento composto central rotacional (DCCR), avaliando o efeito das concentrações de inóculo e de polpa sobre a viabilidade de *L. rhamnosus*, tendo os níveis da concentração de inóculo selecionados com base nos resultados da etapa anterior.
- Realizar estudo cinético sobre a viabilidade de *L. rhamnosus*, produção de ácido láctico e consumo de açúcares nas melhores condições selecionadas nos experimentos do DCCR, durante a fermentação;
- Realizar estudo cinético sobre a viabilidade de *L. rhamnosus*, produção de ácido láctico, ART e pH durante o estoque refrigerado do suco fermentado;
- Realizar estudo cinético da viabilidade *L. rhamnosus* nas condições gastrointestinais simuladas com 28 dias de estoque refrigerado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A principal função dos alimentos é a de fornecer os nutrientes necessários às necessidades metabólicas do organismo. Apesar disto, há três décadas, uma nova ideia vem se difundindo no meio nutricional, que é a de consumir alimentos mais saudáveis e que proporcionem um bem estar para o seu consumidor, sendo estes chamados de alimentos funcionais. O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão para chamar a atenção da população e, assim diminuir os gastos com a saúde. Estes alimentos, se consumidos periodicamente, podem promover, inclusive, o tratamento de algumas doenças crônicas, como a obesidade, a diabetes tipo II, as doenças cardiovasculares e a osteoporose, através da diminuição dos distúrbios metabólicos associados. Atualmente, os alimentos com alegação de propriedades funcionais são os carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolípídeos, organosulfurados, polifenóis e probióticos. (FARR, 1997; BERRY *et al.*, 2002; WALZEM *et al.*, 2004; SIEGRIST *et al.*, 2008; FIGUEROA-GONZÁLES *et al.*, 2011; BRASIL, 2002).

Como parte integrante dos alimentos funcionais, os produtos fermentados vêm ganhando popularidade e aceitação devido aos seus benefícios. A incorporação de, principalmente, bactérias ácido-láticas (BAL) em bebidas e alimentos é uma tendência global, e as propriedades funcionais desses produtos vêm sendo cientificamente demonstradas. Bebidas contendo probióticos fazem parte de um mercado promissor, porém há ainda obstáculos a serem vencidos, como métodos de processamento e estocagem que não inviabilizem as células (PRADO *et al.*, 2015).

Produtos Probióticos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002). Por outro lado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) os define como sendo micro-organismos, que em quantidades adequadas conferem benefícios ao consumidor (VASILJEVIC, 2008). Uma definição mais completa, porém, proposta por Fric *et al.* (2007), é a que probióticos são micro-organismos não patogênicos, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro e que, em doses adequadas, previnem ou tratam determinadas doenças.

O primeiro relato que trata sobre micro-organismo probióticos foi reportado pelo vencedor do Prêmio Nobel Ilya Metchnikoff, há aproximadamente um século, quando afirmou que a longa expectativa de vida de camponeses búlgaros estaria relacionada ao consumo de produtos fermentados do leite. Ele afirmava que os bacilos encontrados nesses produtos influenciavam positivamente o trato intestinal do homem. Hoje em dia, os probióticos mais estudados são os *Lactobacillus* sp. (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. casei*), *Bifidobacterium* sp. e a levedura *Saccharomyces boulardii* (VASILJEVIC *et al.*, 2008 ; KLIGLER *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2011).

Segundo Badaró *et al.* (2008), para garantir alterações favoráveis na microbiota intestinal, é preciso que 100 g do produto contenha entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), ou entre 10^6 e 10^7 UFC/g do produto. A ANVISA (BRASIL, 2008) estabelece que a quantidade mínima de micro-organismos probióticos viáveis, deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação de uso diário do produto pronto para o consumo. Já a FAO/WHO (2006) afirma que o produto deve conter mais que 10^6 UFC/g após 42 dias de estoque. Portanto, a viabilidade dos probióticos é um fator de grande importância para que seu consumo surta efeito no organismo, podendo ser influenciada tanto pelas características de gênero, espécie e linhagem, quanto pela composição e formulação do alimento – acidez, teor de carboidratos, sais minerais, água disponível e fontes de nitrogênio. Os fatores físicos, como a temperatura e o tempo de estocagem, também influenciam na manutenção das células (COELHO, 2009).

A maioria das bactérias é capaz de produzir diferentes substâncias que podem inibir seu próprio crescimento bem como o crescimento de outras, como patógenos, por exemplo. Essas substâncias podem ser toxinas, enzimas bacteriolíticas e subprodutos da via metabólica como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. (PEREIRA & GOMES, 2007).

Os ácidos orgânicos são ácidos carboxílicos com estrutura geral R-COOH, um grupo no qual podem ser incluídos os ácidos graxos e os aminoácidos. Porém, os que estão associados a efeitos benéficos à microbiota intestinal são os de cadeia curta (C1-C7), podendo ser monocarboxilados como o fórmico, o acético, o propiônico e o butírico, ou os que possuem um grupo hidroxila geralmente no carbono α , como o lático, málico, o tartárico e o cítrico. O lático e o acético têm sido utilizados como conservantes de alimentos, mas só se mostram eficazes em ambientes ácidos com pH próximo a 4,0. Os produtos fermentados por

BAL possuem a vantagem de já apresentarem ácidos orgânicos em sua composição, como o láctico. Com isso seu tempo de estoque tende a aumentar, pois haverá a inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos. Para produtos contendo probióticos, onde sua viabilidade é de extrema importância, é preciso, portanto, que haja a presença dos ácidos não dissociados, ou seja, em meio ácido, com pH próximo de 4,0, e de um micro-organismo probiótico que sobreviva nessas condições. (DIBNER & BUTTIN, 2002).

3.1.1. Benefícios

Apesar de os micro-organismos serem encontrados em outras regiões do corpo, o trato gastrointestinal do homem representa o local de maior colonização por diferentes espécies e subespécies. É estimado que existam mais de 100 trilhões de bactérias agrupadas em 1000 espécies. A comunidade procariótica é 10 vezes maior que a eucariótica no corpo humano. Além disso, a composição microbiana é modulada por fatores extrínsecos como dieta, idade, tipo de medicação usada, tipos de tratamento de saúde (radiação, cirurgia), níveis de estresse e doenças (ZHU *et al.*, 2011).

Segundo Dawood *et al.* (2016), as BAL possuem um importante papel na composição da microbiota do indivíduo por produzir substâncias antibacterianas como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, e também por inibir a proliferação de bactérias prejudiciais ao hospedeiro.

Em outro estudo, Figueroa-Gonzáles *et al.* (2011) sintetizaram os benefícios dos probióticos em três mecanismos principais para a promoção da saúde em humanos:

1. Fornecem os produtos finais da fermentação anaeróbica de carboidratos, como ácidos orgânicos, que são absorvidos pelo hospedeiro, sendo capazes de influenciar no humor e na taxa energética;
2. Competem com patógenos, podendo inibir sua proliferação;
3. Produzem determinados polissacarídeos capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro.

Quando ingeridos, os probióticos podem ter um efeito positivo no tratamento e prevenção de doenças específicas, e se mostram moduladores da resposta imune que parte da mucosa e reduz inflamações gastrointestinais causadas por alergias. Mecanismos de ação decorrentes da ingestão de probióticos incluem: estimulação da produção de mucina epitelial, aumento na produção de imunoglobulina A e alívio das inflamações intestinais pelo estímulo à produção de citocinas anti-inflamatórias (WU *et. al.*, 2015).

Em alguns casos, é provável que mais de um mecanismo trabalhe simultaneamente. Na prevenção e no tratamento de infecções gastrointestinais, por exemplo, há uma combinação do efeito de competição com os patógenos com o aumento da resposta imune do organismo do hospedeiro. A maioria dos benefícios reconhecidos da ação dos probióticos está relacionada com doenças do trato gastrointestinal, incluindo diarreia associada ao uso de antibióticos e também a infecções, e à síndrome do intestino irritável. Outros estudos relacionam a ação desses micro-organismos com o tratamento de dermatites em crianças, infecção gástrica por *Helicobacter pylorie* e infecções do trato respiratório (KLIGLER *et al.*, 2008).

Atualmente, um problema de saúde que vem se tornando bastante comum são as alergias sistêmicas, as quais estão associadas a uma baixa exposição a micro-organismos patogênicos ou não, no início da vida. O intestino humano é considerado o maior órgão com funções imunológicas no corpo. Em um sistema gastrointestinal saudável, o sistema imunológico é capaz de criar um equilíbrio entre o nível de proteção fornecido pela mucosa intestinal e a tolerância do sistema como um todo. As espécies de *Lactobacillus* possuem uma importante propriedade de aderência eficiente às células epiteliais do intestino, prevenindo a colonização por patógenos e o crescimento competitivo, e produzindo substâncias que matam ou inibem a ação desses micro-organismos patogênicos (TANG *et al.*, 2015).

Sendo assim, há evidências de que os probióticos auxiliam no tratamento de várias doenças, síndromes e infecções (Figura 3.1). A dermatite atópica, por exemplo, é uma doença inflamatória crônica que atinge a pele, com vários graus de remissão e recaída, e que na metade dos casos, tem origem alérgica. Os tratamentos tradicionais aplicados em crianças incluem a ação de corticoesteróides, o uso de fototerapias e de imunossupressores, que são considerados eficazes, mas que carregam consigo efeitos colaterais indesejados como atrofia da pele e mudanças na pigmentação. O uso de probióticos induz a produção de citocinas

específicas que reequilibram o sistema imune, desequilibrado pela reação alérgica. Crianças com dermatite atópica abrigam mais bactérias do gênero *Clostridium* e menos de bifidobacterias e lactobacillus (WU *et al.*, 2015).

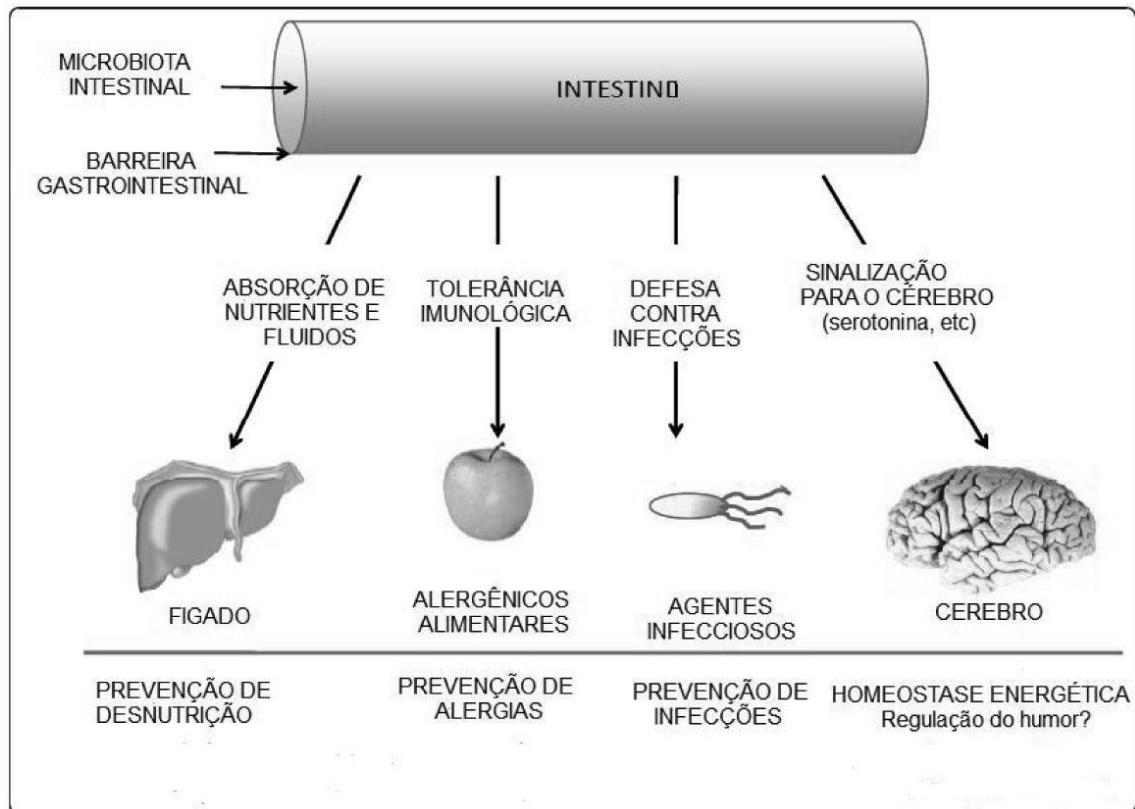


Figura 3.1. Benefícios da ingestão de probióticos (BISCHOFF, 2011).

3.1.2 Sucos de Frutas como Veículos para Probióticos

É muito comum encontrar produtos probióticos de origem láctea, como iogurtes e leites fermentados. Apesar disto, muito se tem estudado sobre a utilização de substratos vegetais, como frutas, legumes e cereais, para a produção de alimentos probióticos. Isto se deve ao fato de que extratos desses vegetais têm se mostrado fontes promissoras de substâncias antioxidantes e, inclusive, antitumorais. Além disso, eles têm a vantagem de não apresentar substâncias alergênicas levando-se em consideração os consumidores que possuem intolerância à lactose, e que não podem se alimentar das bebidas probióticas tipicamente comercializadas. (COELHO, 2009; RAKIN *et al.*, 2007 ; RATHORE *et al.*, 2012; BROWN *et al.*, 2005; PERUARI *et al.*, 2015; SALMERON *et al.*, 2015).

Segundo Pakbin *et al.* (2014), frutas e vegetais são ricos em componentes funcionais como minerais, vitaminas, fibras e antioxidantes. Por serem usualmente consumidos pelas populações em geral, e também serem considerados alimentos saudáveis, os sucos de frutas, em especial, se mostram como veículos apropriados de culturas probióticas (COELHO, 2009). Alguns pesquisadores obtiveram êxito na tentativa de produzir bebidas probióticas, como afirma Prado *et al.* (2008), apesar da dificuldade de adaptação dos micro-organismos às condições ácidas de várias frutas. Estudos realizados por Sheehan *et al.* (2007) mostram que lactobacilos da espécie *L. rhamnosus* são capazes de sobreviver em ambientes com pH em torno de 4,5, por mais de quatro semanas de estocagem, mostrando boa viabilidade celular, mesmo em sucos ácidos como o de laranja e o de abacaxi. Champagne & Gardner (2008) realizaram um estudo de viabilidade das espécies *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, em estoque a uma temperatura de 4°C, observando que todas se mantiveram estáveis até 28 dias, mas que após 80 dias de estoque, apenas *L. rhamnosus*, e *L. reuteri* mantiveram a mesma concentração inicial de células.

Segundo Pereira *et al.* (2013), a sobrevivência de probióticos em matrizes a base de frutas é mais complexa que em produtos lácteos por conta da necessidade de proteção da bactéria do meio mais acidificado, principalmente durante o estoque. Por isso muitos estudos estão sendo realizados para obter linhagens ideais assim como condições de fermentação que contribuam para a obtenção desse tipo de produto, de forma otimizada. Coelho (2009) obteve 9 Log UFC.mL⁻¹ de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 utilizando suco de laranja como veículo. Pereira *et al.* (2011) otimizaram a fermentação de suco de melão pelo *Lactobacillus casei* NRRL B-442. De acordo com os autores, uma boa viabilidade celular foi obtida no final da fermentação (8,3 Log UFC.mL⁻¹), e esse nível foi mantido por 42 dias sob refrigeração. Ellendersen *et al.* (2012) utilizaram a maçã do tipo gala para o crescimento do *Lactobacillus casei* Lcc e obtiveram 7,9 Log UFC.mL⁻¹.

Resistência dos Probióticos– Processamento, Estoque e Trato Gastrointestinal

O processo fermentativo para a produção de bebidas probióticas precisa ser controlado para atingir estabilidade e padrões sensoriais e de segurança. As concentrações de açúcar e outros componentes devem ser cuidadosamente monitorados, tanto durante, quanto depois da fermentação. A exatidão no valor do pH também é crucial para o sucesso de tais processos. Outros fatores a serem considerados incluem a escolha dos substratos, particularmente o tipo de carboidrato, e o pré-tratamento dado aos principais ingredientes, como cereais, frutas, etc., para auxiliar o processo fermentativo. O tempo e a intensidade do aquecimento durante o processo de pasteurização precisam ser levados em consideração. Agentes antimicrobianos como as bacteriocinas, podem ser adicionados para preservar a bebida por um tempo mais longo. A estocagem deve ser realizada em temperatura apropriada para conservar o alimento e manter a viabilidade da cultura. Sendo assim, existem inúmeros parâmetros que devem ser estudados, monitorados e controlados, para que uma fermentação em condições ótimas seja realizada (MARSH *et al.*, 2014).

Diferentemente de bactérias aeróbias, que, em presença de oxigênio, reduzem-no por completo a água, bactérias probióticas não realizam essa transformação, produzindo, ao invés disso, metabólitos tóxicos, como o radical hidroxila $\text{OH}^\cdot$, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânions superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), que, se acumulados, provocam a morte celular. Sendo assim, a concentração de oxigênio durante o estoque deve ser a mínima possível, para evitar a toxicidade e morte das células, e consequente perda de funcionalidade do produto (PEREIRA *et al.*, 2016).

Para que os benefícios de uma cepa probiótica sejam aproveitados pelo hospedeiro, é preciso que esta atinja a área alvo em um estado metabolicamente ativo e em quantidade suficiente. Para que isto ocorra, os micro-organismos precisam ultrapassar várias barreiras, como estresses físico-químicos, enzimáticos e microbianos. A primeira barreira encontrada pelas cepas é o ambiente ácido do estômago, cujo pH pode variar entre 2,5 e 3,5, podendo chegar a 1, em momentos de alta liberação de suco gástrico, ou a 6, após a passagem do alimento para o intestino (RANADHEERA *et al.*, 2012).

Apesar de existirem matrizes alimentares capazes de proteger as células, uma digestão mais demorada no estômago na presença de alimentos pode expor parte do probiótico administrado a condições de acidez por um período de tempo mais longo. Vários micro-organismos probióticos têm sido selecionados por sua maior resiliência contra essas condições de acidez. Um segundo componente estressor é a presença de sais da bile que podem comprometer as membranas dos micro-organismos, devido à sua natureza anfifílica. A produção de hidrolases dos sais biliares por micro-organismos auxilia sua sobrevivência nessa etapa do trajeto (VANDENPLAS *et al.*, 2015).

Para garantir, portanto, os benefícios decorrentes da ingestão de culturas probióticas, é de fundamental importância que seja realizado um estudo da tolerância do micro-organismo aos estresses esperados, por simulação em laboratório (REALE *et al.*, 2015).

Lactobacillus rhamnosus

Lactobacillus rhamnosus é uma espécie muito utilizada na produção de alimentos probióticos, como iogurtes (SCHILLINGER *et al.*, 1999), bebidas de soja (CHAMPAGNE & GARDNER, 2008) e sucos de fruta fermentados (CHAMPAGNE *et al.*, 2009). Chang *et al.* (2013) reportaram que esse micro-organismo é capaz de combater infecções por *Escherichia coli*, podendo também inibir o crescimento de uropatógenos em casos de infecções urinárias. Foi reportado ainda que *Lactobacillus rhamnosus* GG é capaz de reduzir os quadros de diarreia causada tanto por infecção por rotavírus, quanto pelo consumo de antibióticos (FIGUEROA-GONZÁLES *et al.*, 2011).

Essa espécie de lactobacilos é classificada como gram-positiva, heterofermentativa facultativo, ou seja, são bactérias capazes de fermentar hexoses e pentoses, produzindo ácidos láctico, acético e fórmico, além de etanol (LI *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2011). Estudos realizados por Yáñez *et al.* (2008) confirmam a resistência do *L. rhamnosus* a condições ácidas de fermentação com pH próximo a 4,0. Além disso, Silva *et al.* (2013) observaram que essa mesma espécie consegue direcionar o consumo da fonte de carbono para a produção do ácido láctico de forma eficiente, dando preferência a hexoses.

O aumento de biomassa celular de lactobacilos em geral e sua atividade dependem das condições de fermentação, como pH, temperatura e formulação do meio. O gênero *Lactobacillus* cresce em meio variando de levemente ácido a neutro e em temperaturas entre 2 e 53°C, com temperaturas ótimas entre 30°C e 40°C e pH ótimo entre 5,5 e 6,2 (DICKS & ENDO, 2009). Costa *et al.* (2013) reportaram pH e temperatura ótimos em 5,8 e 31°C, respectivamente, para o crescimento de *L. casei*, em suco de abacaxi. Pereira *et al.* (2011) encontrou o pH ótimo em 6,4 e temperatura ótima em 30°C para o crescimento de *L. casei* em suco de caju. Mais especificamente para *L. rhamnosus*, a temperatura ideal de crescimento é de 37°C e o pH varia entre 6,0 e 6,5 (FIGUEROA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2013; LIEW *et al.*, 2005). Entretanto, dependendo do que se queira fermentar é preciso utilizar temperaturas um pouco mais baixas, para que algumas características do meio não sejam perdidas (COELHO, 2009).

Várias aplicações já foram sugeridas para o sobrenadante do caldo fermentado de *L. rhamnosus*, como possíveis tratamentos para inflamações provocadas por alergias no sistema respiratório, e como cosmético, na forma de antioxidante. Essa atividade antimicrobiana do sobrenadante de *L. rhamnosus* já foi demonstrada contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, podendo ser atribuída ao ácido lático e a substâncias como as bacteriocinas (BERISTAIN-BAUZA *et al.*, 2016).

Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*)

A palavra maracujá tem origem tupi e significa alimento em forma de cuia. O maracujazeiro é uma planta trepadeira, com algumas espécies silvestres como árvores pequenas ou arbustos. A coloração e a forma das flores variam conforme a espécie e até com a variedade. O gênero *Passiflora* é o de maior expressividade da família, *Passifloraceae*, com cerca de 400 espécies. O Brasil concentra por volta de 120 dessas espécies, sendo o país com maior número de espécies nativas, onde mais de 60 produzem frutos comestíveis. As espécies comerciais estudadas possuem qualidades nutritivas, sendo rico em minerais e vitaminas (CAMPOS, 2010).

Popularmente conhecido como maracujá-cincinnata, maracujá da Caatinga ou maracujá-do-mato (*P. cincinnata* Mast.), esta espécie de maracujá pode ser encontrada em abundância em Goiás, Minas Gerais e Bahia. Na região Nordeste ela é comercializada na entressafra do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*), uma vez que se trata de uma espécie adaptada às condições locais de cultivo, por ser nativa da região, além de apresentar uma excelente opção de renda para os pequenos agricultores. Tem como desvantagem uma baixa porcentagem de germinação, necessitando de tempo de armazenamento superior a dois anos. Por outro lado, a *P. cincinnata* é altamente resistente a pragas e doenças, não sendo necessária a aplicação de agrotóxicos no seu plantio (SANTOS *et al.*, 2012).

O cultivo dessa fruta, no entanto, ainda é realizado de forma extrativista, e em áreas de cultivo doméstico. Porém, aos poucos, vêm aumentando o número de produtos que se utilizam dela, como geléias e gelatinas, por exemplo, por pequenas indústrias locais (AZOUBEL *et al.*, 2011). O maracujá da Caatinga (Figura 3.2) tem chances de se tornar um produto de importância econômica no mercado nacional. O consumo da fruta *in natura* ou processada e o incentivo para seu plantio poderia proporcionar melhoria na renda de populações pobres do meio rural. Além disso, o crescente interesse dos consumidores por frutas tropicais, aliado ao número cada vez maior de pequenas indústrias de processamento de frutas para a produção de polpa, poderá tornar os produtos derivados dessa fruta um negócio rentável (AZOUBEL *et al.*, 2010).



Figura 3.2 - Maracujá da Caatinga (*P. cincinnata*). À esquerda, ainda no maracujazeiro. À direita, corte transversal do fruto, mostrando polpa e sementes.

Fonte: Souza, 2013

Método de superfície de resposta com planejamento por Delineamento composto central rotacional

A metodologia de superfície de resposta tem sido bastante utilizada para modelar pesquisas sobre otimização de processos em nível experimental (MATTIETTO *et al.*, 2012, COSTA *et al.*, 2013). Além disso, existem diferentes delineamentos que possibilitam planejar os tratamentos de forma mais econômica. No planejamento de experimentos, onde o objetivo principal é caracterizar a relação entre uma ou mais variáveis resposta e um conjunto de fatores de interesse, procura-se construir um modelo que descreva a variável resposta em função dos intervalos estudados desses fatores. Então, por meio do Método de Superfície de Resposta (MSR), é possível aproximar um modelo empírico a uma relação entre os fatores e a resposta do processo. Essa função que relaciona tais variáveis é chamada de superfície de resposta (MENDONÇA, 2012).

O modelo completo mais comumente utilizado baseado em n observações de Y , medidas em diferentes combinações entre os níveis dos fatores A e B , é representado pela Equação 1.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 a_i + \beta_2 a_i^2 + \beta_3 b_j + \beta_4 b_j^2 + \beta_5 a_i b_j \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que,

a_i é o valor do nível i do fator A

b_j é o valor do nível j do fator B

β_k é o parâmetro do modelo, com $k = 0, 1, \dots, 5$

Ainda segundo Mendonça (2012), na maioria dos estudos por superfície de resposta, a forma do relacionamento entre a variável resposta e os fatores é desconhecida. A qualidade das estimativas dos parâmetros depende principalmente do método de estimação utilizado e da utilização de planos adequados para a coleta de dados. Esses planos são denominados delineamentos para superfície de resposta. A fase do delineamento é importante porque define as combinações entre os níveis dos diversos fatores estudados, e permite estimar a superfície de resposta com qualidade. Dentre os delineamentos mais econômicos, destacam-se os delineamentos compostos centrais (DCC).

O DCC é constituído de três partes, a cúbica (fatorial), a axial (α) e a central. Em geral, um DCC para k fatores, cujos níveis codificados serão combinados, é dado pelo conjunto dos seguintes tratamentos com níveis codificados:

Parte cúbica (2^k combinações):

$(1,1,...,1); (-1,1,...,1);...; (-1,-1,...,-1)$

Parte axial (2^k combinações + ponto central):

$(-\alpha,0,...,0); (\alpha,0,...,0); (0,-\alpha,...,0); (0,\alpha,...,0);...; (0,0,...,-\alpha); (0,0,...,\alpha)$

Parte central:

$(0,0,...,0)$

No total são $k^2 + 2k + 1$ combinações entre os níveis dos k fatores estudados. Portanto o DCC para dois fatores A e B, com níveis codificados sem repetição no ponto central, resulta em nove tratamentos ($2^2 + 2.2 + 1$) (Tabela 3.1).

É o valor de α que particulariza um DCC, pois sua escolha pode minimizar o desvio da superfície de resposta e dar ao delineamento uma propriedade rotacional. A esta particularização do DCC dá-se o nome de delineamento composto central rotacional (DCCR).

Tabela 3.1 - Combinações entre os níveis codificados de um DCC com dois fatores A e B

Tratamentos	Fatores Codificados		
	A	B	
1	-1	-1	Pontos Cúbicos
2	1	-1	
3	-1	1	
4	1	1	
5	$-\alpha$	0	Pontos Axiais
6	α	0	
7	0	$-\alpha$	
8	0	α	
9	0	0	Ponto Central

Fonte: Mendonça (2012) (modificado)

Perázio (2010) afirma que qualquer valor pode ser adotado para α e para o número de repetições do ponto central. Porém um DCC com dois fatores apresenta propriedades especiais quando α é igual 1,4142 e o número de pontos centrais é igual a cinco. Desta forma, ele assume propriedades de rotacionalidade e ortogonalidade, facilitando o tratamento estatístico. Nesses casos, o valor de α pode ser calculado pela Equação 2.

$$\pm\alpha = \pm \sqrt[4]{2^k} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde,

k é o número de fatores

O método por DCCR tem sido bastante utilizado em experimentos relacionados à otimização do meio para culturas probióticas. Pandey & Mishra (2015) o utilizaram para obter a melhor concentração de inóculo combinado com a melhor temperatura para a preparação de um iogurte probiótico de soja. Costa *et al.* (2013) otimizaram o crescimento de *L. casei* em suco de abacaxi trabalhando com os parâmetros temperatura e pH.

Validação de Metodologias Analíticas

A determinação exata e específica de nutrientes contidos em alimentos é muito importante, pois permite o estudo da relação entre dieta, com o conhecimento dos elementos que compõem o alimento, e saúde dos indivíduos consumidores. Muitos métodos vêm sendo reportados com o propósito de avaliar ácidos orgânicos em sucos de frutas, como cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia a gás (CG), acopladas a diferentes tipos de detectores. Milagres *et al.* (2012) afirmaram que a CLAE é uma técnica de separação que vem sendo utilizada por sua eficiência na separação de ácidos orgânicos e açúcares em diferentes tipos de amostras. Os mesmos autores afirmaram que mais especificamente a CLAE por exclusão iônica é uma técnica que permite separar pequenas moléculas de ácidos fracos, sendo particularmente útil na separação de ácidos orgânicos.

A ANVISA, de acordo com a resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, divulgou aspectos relacionados à validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003). Segundo esta resolução, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez, adequados à análise (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Parâmetros considerados em uma validação de metodologia

Parâmetros	Descrição
Especificidade e Seletividade	É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
Linearidade	É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
Precisão	A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.
Limite de Detecção	É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.
Limite de Quantificação	É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.
Exatidão ou Acurácia	A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro
Robustez	A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Fonte: Resolução RE N°899, 2003 (modificada)

A norma ISO/IEC 17025 - Requerimentos gerais para Laboratórios de Ensaio e Calibração, define validação de um método analítico como a “comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”. O processo de validação de um método deve estar descrito num procedimento laboratorial, e as determinações dos parâmetros de validação devem ser realizadas em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados (PARREIRA, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Uma cultura comercial de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi adquirida da ATCC (American Type Culture Collection, USA). A cultura foi reidratada em 100 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa & Sharpe - MERCK, KGaA Germany) e incubada por 24h a 37°C. Posteriormente, a biomassa crescida foi inoculada em tubos inclinados contendo MRS-ágar e em seguida, novamente incubada a 37°C por 24h. As colônias crescidas nos tubos foram transferidas para um meio composto por 100 g.L⁻¹ de glicose (DINÂMICA, São Paulo, Brasil) e 10 g.L⁻¹ de gelatina, e distribuídos em frascos de penicilina para liofilização, 2 mL em cada. As suspensões liofilizadas foram estocadas a 4°C até o momento do uso.

Obtenção e processamento do Maracujá da Caatinga (*P. Cinnata*)

Os frutos do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cinnata*) utilizados nos experimentos foram provenientes de cultivo conduzido no Campo Experimental da Caatinga da Embrapa Semiárido, em Petrolina-PE. Os maracujás foram previamente selecionados observando-se algumas características, como cor, danos físicos, estado de maturação, qualidade da casca e tamanho. Posteriormente, foram lavados em água corrente e sabão neutro para a retirada das sujidades, colocados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LabBio) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Ao chegarem, foram lavados em água corrente e sabão neutro para a retirada das sujidades. O enxágue foi feito com água destilada e os frutos foram colocados em bancadas para secar naturalmente. Os maracujás foram cortados manualmente com faca de aço inoxidável e, em seguida, o fruto foi despulpado e desmembrado das sementes com o auxílio de uma peneira. A polpa, então, foi guardada em freezer a -20 °C.

Inóculo e Fermentação

O inóculo foi preparado utilizando um frasco do liofilizado do *L. rhamnosus* ATCC 7469, mantido a 4°C, tendo sido as células ressuspensas com 2mL de caldo MRS e esta suspensão adicionada a um frasco de 125mL contendo 48mL de caldo MRS, o qual foi incubado a 37°C por 24h. Após o tempo de incubação, foram retiradas as alíquotas para a inoculação nos sucos, os quais foram preparados com as diferentes concentrações de polpa diluída, nas várias etapas do estudo, e submetidos a uma pasteurização em banho-maria de 65°C por 35 minutos, com posterior banho de gelo. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1M. A temperatura, o tempo de incubação e a concentração de inóculo também variaram de acordo com as etapas.

Quantificação dos açúcares

Os teores de açúcares redutores totais foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNSA), segundo Miller (1959). Para determinação da concentração, 1 mL de amostra foi adicionado a um tubo de ensaio e os carboidratos nela contidos foram hidrolisados com 1 mL de HCl concentrado a 67°C por 7 minutos, com posterior banho de gelo. Em seguida, a mistura foi neutralizada com NaOH 6M, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Após a hidrólise ácida, 0,5 mL do hidrolisado foi adicionado a tubos de ensaio contendo 1 mL de DNSA. A mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e depois resfriada em banho de gelo. Foram adicionados 20 mL de água destilada à solução e realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (700 Plus, Femto).

Quantificação da Viabilidade Celular e Determinação do pH

A quantificação da viabilidade celular foi realizada pela técnica spread-plate de contagem de células viáveis em placas. As amostras contendo as células foram diluídas serialmente em solução salina 0,9% (m/V) e essas diluições foram, então, plaqueadas em placas de Petri com meio ágar MRS adicionado de glicose (20 g.L⁻¹), as quais foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas. O pH foi determinado em potenciômetro Jenway 3510.

Caracterização físico-química da Polpa do Maracujá da Caatinga

Para a caracterização da polpa do Maracujá da Caatinga, foram realizadas as análises de açúcares redutores totais, de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (ZENEBAON *et. al.*, 2008) e ácidos orgânicos (cítrico e málico), pelo método cromatográfico validado.

Validação da Metodologia para Quantificação Simultânea dos Ácidos Cítrico, Ascórbico, Málico e Lático

Reagentes utilizados

Foi utilizado metanol pra cromatografia líquida de alta eficiência (J. T. BAKER), ácido sulfúrico P.A. (Neon), ácidos cítrico e málico (Vetec), ácido ascórbico (US Pharmacopeia) e ácido láctico 85 % V/V(Sigma-Aldrich).

Condições cromatográficas

A validação foi realizada em cromatógrafo a líquido de alta eficiência, equipado com uma bomba quaternária, acoplado a um sistema desgaseificador (DGU-20A5r), com um forno para controlar a temperatura da coluna, esta fixada em 28°C, e um injetor automático (20 µL injeção), com um detector por arranjo de diodos (SPD-M20A), trabalhando em uma faixa que vai de 190-800nm. O software utilizado foi o LC-Solutions fabricado pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan). A coluna usada no método foi de troca iônica de 300mm x 7.8mm x 9 µm (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, USA). A eluição foi feita isocraticamente com fase móvel composta de H₂SO₄5mM, com fluxo de 0.6 mL/min.

Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos

O detector por arranjo de diodo (DAD) foi usado para obter os espectros específicos de cada ácido. As amostras foram identificadas comparando as polpas diluídas e os produtos de fermentação com os padrões e suas identificações foram confirmadas pelos tempos de retenção. A quantificação foi realizada construindo-se uma curva de calibração de sete pontos.

Validação do método

A linearidade do método foi avaliada pela construção da curva de calibração de cada ácido, plotando-se as áreas dos picos em função das concentrações. A linearidade foi avaliada por regressão usando-se o coeficiente de determinação. A precisão foi realizada usando-se a repetibilidade, e avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR %) das amostras contendo a mistura dos padrões dissolvidos em fase móvel. A robustez foi expressa pela resolução de cada pico, as quais foram calculadas pela razão entre o tempo de retenção e a largura de cada um deles. O limite de quantificação foi determinado como sendo a concentração mínima de analito, a partir da qual se obtém uma altura de pico 10 vezes maior que o ruído. Já o limite de detecção corresponde a 3 vezes o valor do ruído (Harris, 2009). O produto fermentado foi enriquecido com uma concentração conhecida dos ácidos para se determinar a acurácia, calculando-se a taxa de recuperação, ou seja, a relação do que se tinha inicialmente nas amostras mais o adicionado, daquele detectado pelo equipamento.

Aplicação do método

O método foi aplicado utilizando amostras da polpa fermentada por *Lactobacillus rhamnosus*. A fermentação foi realizada com 1,5% V/V de inóculo e 10% V/V de polpa, em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de fermentação. A incubação foi realizada a 30°C por 24h.

Ensaio Preliminares

Para verificar se o micro-organismo seria capaz de fermentar o suco do maracujá da Caatinga, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de inóculo (0,1%, 1,0% e 5,0% V/V) em tubos contendo suco com 10% V/V de polpa, a 30°C. Também foram realizados experimentos variando a temperatura (30°C, 33,5°C e 37°C), com 1% V/V de concentração de inóculo. Em ambas situações, foram analisados pH, viabilidade e concentração de ART. As fermentações foram realizadas em duplicata, durante 12 horas.

Delineamento Composto Central Rotacional

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para investigar as melhores condições de cultivo para uma maior relação entre a viabilidade final do *L. rhamnosus* e o pH final, assim como a produção de ácido lático. As duas variáveis escolhidas foram a concentração do inóculo e a concentração de polpa. Os níveis para as variáveis foram selecionados baseados nos níveis iniciais de concentração de polpa e inóculo nos pontos centrais, valores estes baseados nos melhores resultados obtidos nos ensaios preliminares (Tabela 4.1). As duas variáveis escolhidas foram designadas como x_1 (concentração de inóculo) e x_2 (concentração de polpa). Um total de 10 ensaios foram realizados. Foram analisados viabilidade, pH, concentração de ácido lático e ART. Dois modelos polinomiais gerados em função das duas variáveis, de acordo com as respostas preditas, estão representadas na Equação 3.

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:

$i = 1 \text{ e } 2$

$\hat{y}$ é a razão entre Log (UFC.mL⁻¹) final e pH final; $\hat{y}$ é a concentração de ácido lático.

Tabela 4.1 - Níveis do DCCR para as condições de fermentação

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Inóculo (% V/V)	0,09	0,5	1,5	2,5	2,91
Polpa (% V/V)	2,95	5	10	15	17,05

4.9.1 Condições de Fermentação

Os sucos se encontravam em tubos de ensaio contendo cada um o volume necessário para que, com a adição do inóculo, fosse obtido valor final de 15 mL. Os sucos foram preparados com as diferentes concentrações de polpa diluída, e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1M, sendo posteriormente submetidos a uma pasteurização em banho-maria de 65°C por 35 minutos. A incubação dos meios de fermentação foi feita a 37°C por 24h.

Validação do Modelo Polinomial

Um estudo cinético foi realizado sob as melhores condições de fermentação, obtidas pelo modelo polinomial de crescimento, e as amostras foram incubadas a 37°C por 27h. Alíquotas foram coletadas a cada 4h para análise de pH, viabilidade, ART, e ácidos orgânicos (citríco, málico e láctico).

Análise do Estoque

A análise do estoque foi realizada com a melhor formulação (2,91% V/V de inóculo e 14,45% V/V de polpa), fermentada a 37°C por 27h, acrescida de 14 g.L⁻¹ de sacarose, sendo mantida a 4°C, e a cada 7 dias foram coletadas alíquotas para a análise de viabilidade, ART, pH e ácido láctico, por 28 dias.

Sobrevivência do *L. rhamnosus* sob simulação das condições gastrointestinais

O estudo da sobrevivência da cultura probiótica em simulação das condições gastrointestinais, com 28 dias de estoque refrigerado, foi realizado de acordo com Brinques & Ayub (2011) e Tuo *et al.* (2013) com modificações. Um volume de 10 mL das amostras foi centrifugado (6.720 g, 10 min, 4°C). As células foram, então, suspensas em solução salina (0,9 % m/V) contendo 3,0 g.L⁻¹ de pepsina (simulação das condições gástricas – SCG) e o pH ajustado para 2,7 , 2,5 e 2,0 com HCl 5M. A simulação das condições intestinais (SCI) foi feita adicionando-se 1,0 g.L⁻¹ de pancreatina em solução salina 0,9% m/V com ajuste de pH para 7,0 com NaOH 18M. A resistência foi avaliada em termos de viabilidade, após incubação a 37°C por 0, 60 e 120 minutos em SCG e em 240 minutos em SCI.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software Microcal Origin 6.0 para Windows e o Statistica versão 7.0. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada na determinação do nível de significância. Todos os valores representam a média ($\pm$ Desvio Padrão, DP) obtida a partir do tratamento de três replicatas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química da polpa do Maracujá da Caatinga

As características climáticas e a exposição da planta e frutos à insolação podem influenciar no crescimento e qualidade do fruto. Segundo Campos (2010), as características físico-químicas de frutas do gênero *Passiflora* podem ser influenciadas por fatores como estado de maturação, idade das plantas, condições climáticas, estado nutricional, polinização, fertilização do solo e o manejo da água utilizada na irrigação. Sendo assim, a produção e a qualidade de frutos de maracujá podem variar entre regiões e localidades, conforme manejo adotado.

O pH da polpa do maracujá foi determinado em pHmetro (3510, Jenway), apresentando um valor de $3,0 \pm 0,2$. Segundo a Instrução Normativa Nº01/2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000), a polpa do maracujá destinada ao consumo como bebida deve estar com pH entre 2,7 e 3,8. Pelo método Kjeldhal foi determinada uma concentração de 1,2 g N/100g polpa, e o teor de ART no suco preparado com polpa diluída 10% (V/V), foi de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$. A concentração de ART se mostrou próxima àquela encontrada no suco de acerola a 10 % V/V, que, segundo Caetano *et al.* (2012), possui $5,1 \text{ g.L}^{-1}$. Quanto aos ácidos orgânicos, a polpa apresentou $45,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico e $8,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido málico, não tendo sido possível quantificar o ácido ascórbico, devido à sua rápida degradação. Na EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agripecuária) Semiárido, no campo experimental de Petrolina, de onde foram colhidos os frutos usados no projeto, foram detectados entre 40 e 70 g.L^{-1} de ácido cítrico em diferentes colheitas. Além disso, foi detectado entre 0,4 e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido ascórbico na fruta.

Pita (2012) encontrou $95,1 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico, e Zeraik *et al.* (2010) encontraram $3,85 \text{ g/L}$ de ácido málico. Essa variação pode ser explicada pelo estado de maturação da fruta, que está diretamente relacionado à sua época de colheita (Pita 2012). O ácido cítrico é o acidulante mais comum em alimentos produzidos em escala industrial. Altas concentrações de ácido cítrico diminui a necessidade de adição de acidificantes. O ácido málico é o segundo ácido mais abundante em frutas, e é um dos responsáveis pelo sabor e aroma do produto (SEQUEIRA, 2012).

Validação da Metodologia para Quantificação Simultânea dos Ácidos Cítrico, Ascórbico, Málico e Lático

Especificidade e Seletividade

Houve a separação dos picos de cada um dos padrões, mas, ao invés de 3 picos, apareceram 5, já que o padrão do ácido láctico tinha 85% de pureza (Figura 5.1). O último pico, com a maior área foi considerado para a identificação deste ácido, com um tempo de retenção de $12,52 \pm 0,01$ min.

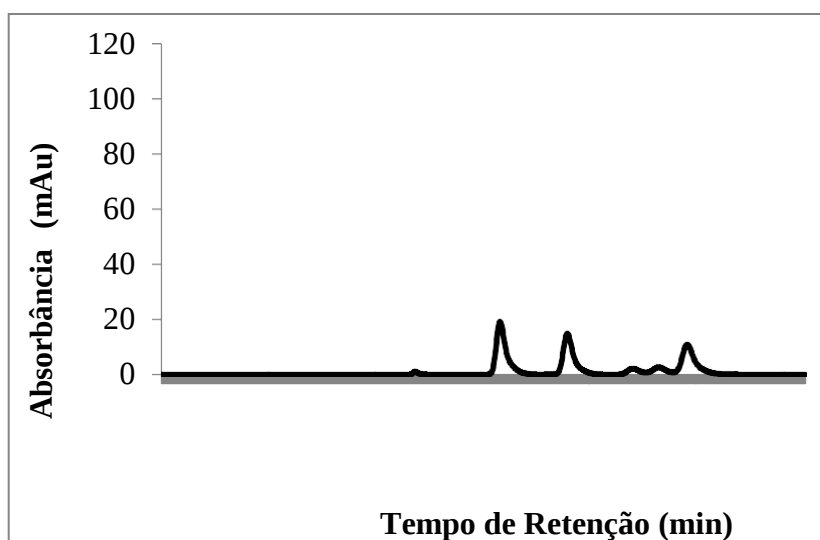


Figura 5.1 - Cromatograma obtido da mistura dos padrões

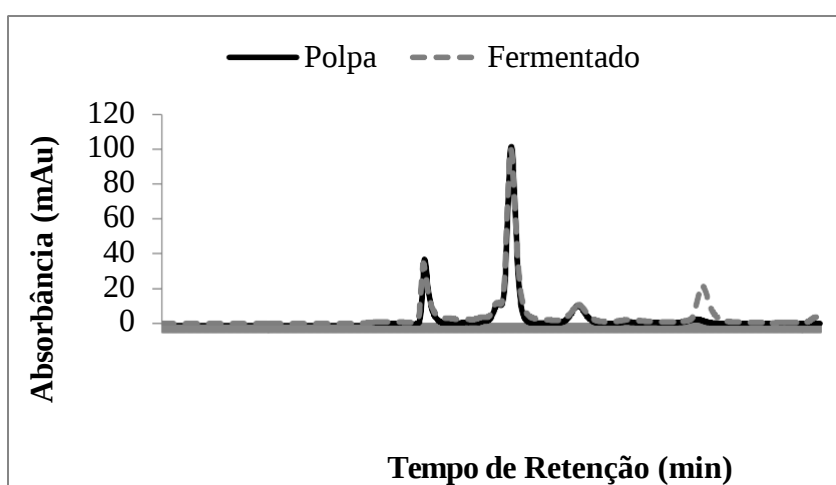


Figura 5.2 - Cromatogramas da polpa e do fermentado: ácido cítrico ($8,22 \pm 0,04$ min); ácido málico ($9,75 \pm 0,02$ min); ácido láctico ($12,52 \pm 0,01$ min).

Os perfis cromatográficos da polpa e do produto fermentado (Figura 5.2) se mostraram similares, à exceção do ácido láctico, que, antes da fermentação, se encontrava praticamente nulo, confirmando mais uma vez que o quinto pico é aquele que lhe identifica. O composto com um tempo de retenção de 5,6 minutos, presente tanto na polpa, quanto no produto fermentado, não foi possível de ser identificado. Para confirmar a seletividade do método, os espectros eletromagnéticos dos compostos em estudo foram analisados, comparando-se os dos padrões com as amostras (Figura 5.3). Os ácidos cítrico e láctico apresentaram máximos de absorção em 210 nm, e o málico em 200 nm.

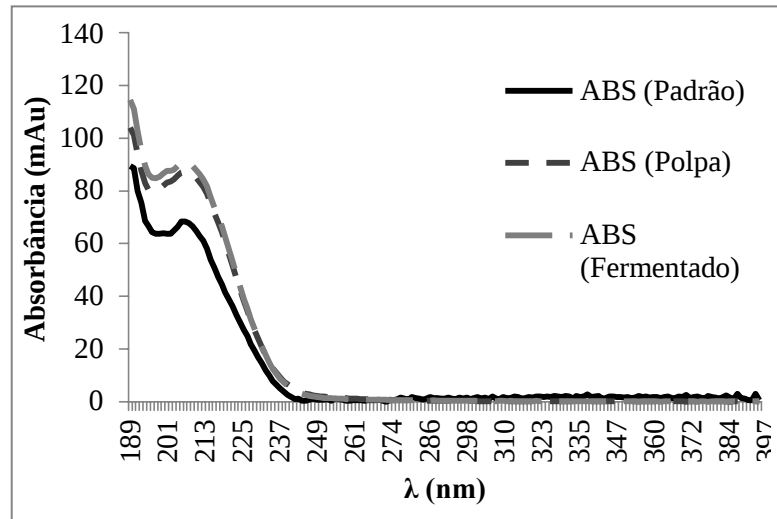


Figura 5.3A

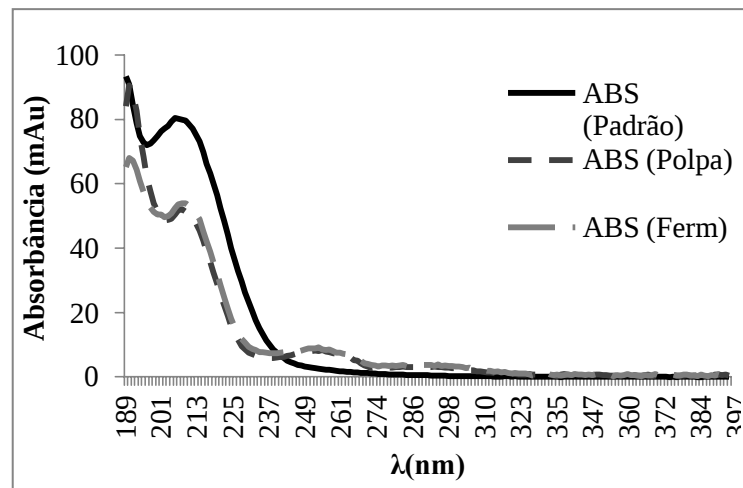


Figura 5.3B

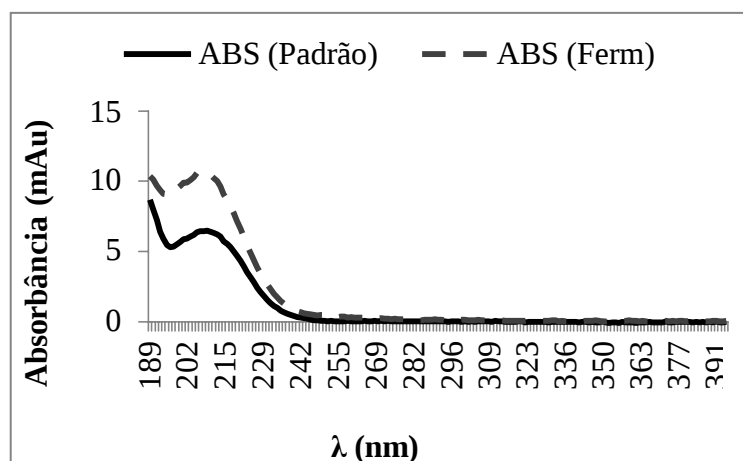


Figura 5.3C

Figura 5.3 - Espectros eletromagnéticos dos padrões e das amostras: ácido cítrico na polpa e no fermentado (A); ácido málico na polpa e no fermentado (B); ácido láctico (C).

Robustez

A robustez do método foi avaliada testando-se dois fluxos diferentes 0,6 e 0,7 mL/min. A Tabela 5.1 mostra os tempos de retenção para cada ácido, cítrico, málico e láctico, tendo sido a resolução calculada por comparação dos tempos de retenção e largura dos picos para dois ácidos subsequentes (cítrico/málico e málico/láctico). Pode-se observar que com o aumento do fluxo, ocorre uma diminuição na resolução, mas ainda assim, ela se mostra adequada ao método, pois se mantém acima de 0,5, de acordo com a Equação 4, provando a robustez do método.

$$R = \Delta t_R / (W_1 + W_2) \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde,

R → Resolução

Δt_R → Diferença entre tempos de retenção

W_1 → Largura do primeiro pico cromatográfico

W_2 → Largura do pico cromatográfico subsequente ao primeiro

Tabela 5.1 - Tempos de retenção dos ácidos, usados para o cálculo da resolução dos picos em dois fluxos distintos.

Fluxo (mL/ min)	Cítrico (min)			Málico (min)			Lático (min)			Resolução	
	t_0^a	t_f^b	t_r^c	t_0^a	t_f^b	t_r^c	t_0^a	t_f^b	t_r^c	Cítrico/ Málico	Málico/ Lático
0,6	7,61 ±0,04	8,82 ±0,05	8,22 ±0,04	9,18 ±0,02	10,32 ±0,04	9,75 ±0,02	11,95 ±0,01	13,09 ±0,02	12,52 ±0,01	0,65 ±0,01	1,21 ±0,04
0,7	6,41 ±0,05	7,53 ±0,03	6,97 ±0,01	7,68 ±0,07	8,91 ±0,05	8,29 ±0,05	10,25 ±0,01	11,20 ±0,01	10,72 ±0,01	0,56 ±0,04	1,12 ±0,03

^aTempo inicial ^bTempo final ^cTempo de retenção

Linearidade

A linearidade do método foi validada utilizando-se as mesmas concentrações de cada ácido (cítrico, málico e lático). Para cada um deles foi construída uma curva de calibração por regressão linear, com a área em função das massas. O coeficiente angular e o quadrado do coeficiente de determinação (R^2) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados (Tabela 2). As curvas de calibração foram lineares para todos os ácidos investigados, nas concentrações estudadas, com o R^2 acima de 0,9979. Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) indicam uma boa sensibilidade do método com os valores mais altos em 0,24 μ g e 0,74 μ g, respectivamente. Todos os ácidos mostraram quantidades abaixo da unidade.

Tabela 5.2 - Coeficientes angular e de determinação das curvas de regressão obtidas para cada ácido orgânico e seus limites de detecção e quantificação.

Ácido orgânico	Massa (μ g)	Inclinação	R^2	LD* (μ g)	LQ**(μ g)
Cítrico	0,625 – 3,275	98152	0,9979	0,08	0,23
Málico	1,000– 3,000	87858	0,9998	0,18	0,56
Lático	1,000 – 3,000	75783	0,9999	0,24	0,74

* Limite de Detecção

**Limite de Quantificação

Precisão

A precisão do método foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações do analito após sete corridas seguidas das soluções padrão e dos fermentados contendo cada um dos compostos em estudo (Tabela 5.3). O desvio mais alto dentre os padrões ocorreu no ácido cítrico, com 0,63%, e dentre as amostras de fermentados foi no ácido lático, com 1,62%, valores aceitáveis para uma boa precisão de método. Scherer *et al.* (2012) encontraram valores similares para os ácidos cítrico e málico em frutas e sucos, usando um método de separação com coluna de fase reversa. Em uma matriz diferente, amostras de leite, Milagres *et al.* (2012) reportaram DPR% em uma faixa de 1,66 – 6,97% para a precisão do ácido lático usando cromatografia por exclusão iônica. O mesmo método

cromatográfico foi usado por Chinnici *et al.* (2005) em sucos de frutas, obtendo um valor de 1,12% (DPR) para o ácido cítrico.

Exatidão

A exatidão foi determinada através da análise de amostras dos fermentados, após 27h de incubação, às quais foi adicionada uma quantidade conhecida de padrões (cítrico, málico e lático). As taxas de recuperação se encontram na Tabela 5.3, e foram calculadas pela diferença entre a verdadeira quantidade total de cada ácido com os valores obtidos após seis corridas em sequência no cromatógrafo líquido. O ácido málico mostrou a mais baixa reprodutibilidade nas condições propostas, com uma taxa de recuperação de 73%. O cítrico e o lático apresentaram boas taxas de recuperação, acima de 95%, valor próximo ao encontrado por Milagres *et al.* (2012) para ácido lático em amostras de leite, também usando um método cromatográfico por exclusão iônica. Todos os ácidos estudados estão dentro da faixa aceitável para recuperação, entre 70% e 120% (LANÇAS, 2009).

Tabela 5.3 - Precisão (N = 7) e exatidão (N = 3) na determinação dos ácidos cítrico, málico e lático nos padrões e nos fermentados.

Ácido	Precisão		Exatidão			
	Padrão DPR (%)	Fermentado DPR (%)	Fermentado (g/L) - 27 h	Adição à amostra (g/L)	Valores encontrados (g/L)	Recuperação (%)
Cítrico	0,63	0,71	0,43	2,10	2,05 ± 0,01	97,66 ± 0,69
Málico	0,32	0,59	0,33	1,99	1,46 ± 0,01	72,89 ± 0,38
Lático	0,16	1,62	1,10	2,76	2,65 ± 0,04	95,82 ± 1,55

O método validado para os ácidos cítrico, málico e lático, não se mostrou preciso e exato ao ácido ascórbico, devido à rápida degradação sofrida por este ácido.

Análise dos Fermentados

Após 24h de incubação as amostras de fermentadas foram centrifugadas a 6.720 g, por 10 min em microcentrífuga KASVI (K14-1215), e o sobrenadante foi utilizado para a análise dos ácidos cítrico, málico e láctico, com volume de injeção de 20 μL . Antes da fermentação, a polpa diluída a 10% V/V se encontrava com 4,6 g.L^{-1} de cítrico e 0,9 g.L^{-1} de málico, não tendo sido detectado ácido láctico. A Tabela 5.4 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5.4 - Concentração dos ácidos cítrico, málico e láctico nos fermentados utilizados para a aplicação do método

Ácidos	Inclinação	Áreas	Concentração (g.L^{-1})
Cítrico	1×10^{-5}	889988	$4,9 \pm 0,1$
		917517	
		887253	
Málico	8×10^{-6}	125897	$0,6 \pm 0,0$
		138242	
		134674	
Láctico	1×10^{-5}	389141	$2,6 \pm 0,1$
		382966	
		359965	

Efeito do tamanho do inóculo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 na fermentação de suco do Maracujá da Caatinga

Inicialmente, as concentrações celulares (0h) foram de 6,72, 7,72 e 8,41 Log UFC.mL⁻¹ para os inóculos com 0,1, 1 e 5 % V/V, respectivamente. Ao final da fermentação, a viabilidade celular aumentou para 7,84 e 9,52 Log UFC.mL⁻¹, nos inóculos de 0,1 e 1%, respectivamente, ficando praticamente constante no inóculo 5% V/V, com 8,78 Log UFC.mL⁻¹. O maior crescimento foi observado no inóculo 1%V/V (23,3%), seguido do 0,1% V/V (16,6%) e 5% V/V (4,31%) (Figura5.4).

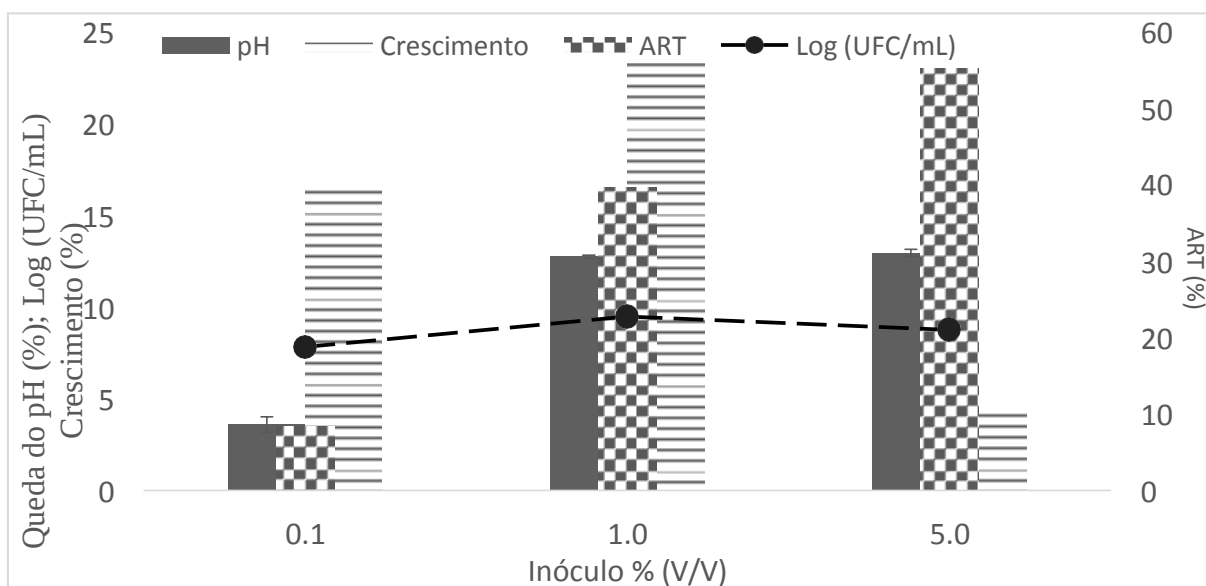


Figura 5.4 - Queda do pH, viabilidade *L. rhamnosus* ATCC 7469 (Log UFC.mL⁻¹), taxa de crescimento (%) e consumo de ART na fermentação com três diferentes concentrações de inóculo, empregando-se 10% (V/V) de polpa a 30°C por 12h.

Os valores encontrados estão de acordo com as exigências impostas pela legislação, uma vez que, os inóculos de 1 e 5% (V/V) encontram-se na faixa recomendada de 8,00 Log UFC.mL⁻¹ e 9,00 Log UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 2003). Costa *et al.* (2013) e Fonteles *et al.* (2011) também obtiveram alta viabilidade celular, 8,34 e 8,98 Log UFC.mL⁻¹, respectivamente, quando fermentaram suco de abacaxi e de melão utilizando o probiótico *L. casei*. Pereira *et al.* (2013) observaram viabilidade similar (8,3 Log UFC.mL⁻¹) quando fermentou suco de caju com *L. casei*. Os sucos de frutas podem representar ótimo veículo para incorporação de probióticos, dado que contêm quantidades elevadas de açúcares que estimulam seu crescimento.

Analisando o consumo de ART das amostras fermentadas, pode-se verificar que o meio de fermentação favoreceu o crescimento dos inóculos com menor concentração celular. Contudo, os açúcares presentes não foram suficientes para suprir o crescimento do inóculo de 5% (V/V), destinando-os para manutenção celular. Porém, a quantidade consumida segue a lógica de que quanto maior for a concentração inicial de inóculo maior será o consumo desses açúcares, seja para o crescimento no número de células, seja para a sua manutenção. Nota-se que o inóculo de 1% V/V apresentou um expressivo aumento no número de células viáveis no meio, chegando a quase 24% de crescimento, e um consumo considerável de açúcares de 40% em relação ao total inicial de 5 g.L⁻¹ na polpa diluída 1:10. Fica evidente mais uma vez que

uma adição de 5% V/V de inóculo consome os açúcares apenas para a manutenção deste número inicial de células. Os valores iniciais do pH nos meios (tempo zero) variaram, já que diferentes volumes de inóculo foram adicionados. Assim, tendo sido o pH do suco ajustado para 6,0, os valores iniciais ficaram em 5,97, 5,35 e 5,31, para os inóculos 0,1, 1 e 5% v/v, respectivamente. A diminuição dos valores, ao final das 12h, ficou em 5,75, 5,0 e 4,62 para os inóculos de 0,1, 1 e 5% v/v, respectivamente. Tal redução se deve à produção do ácido láctico, produto final da fermentação láctica (SILVEIRA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013). Sua presença no meio de fermentação induz ação antimicrobiana (SILVEIRA *et al.*, 2010).

A Figura 5.5 apresenta a queda no pH, a viabilidade, o crescimento celular e a concentração de ácido láctico, para as três temperaturas diferentes de incubação do meio de fermentação contendo 1 % V/V de inóculo. Para todos os fatores estudados, a temperatura de 37°C se mostrou mais adequada. A temperatura de 30°C se mostrou boa para a produção de ácido láctico, apesar do crescimento ter sido baixo, e a 33,5°C a produção do ácido foi próxima a de 30°C, mas o crescimento celular foi mais acentuado.

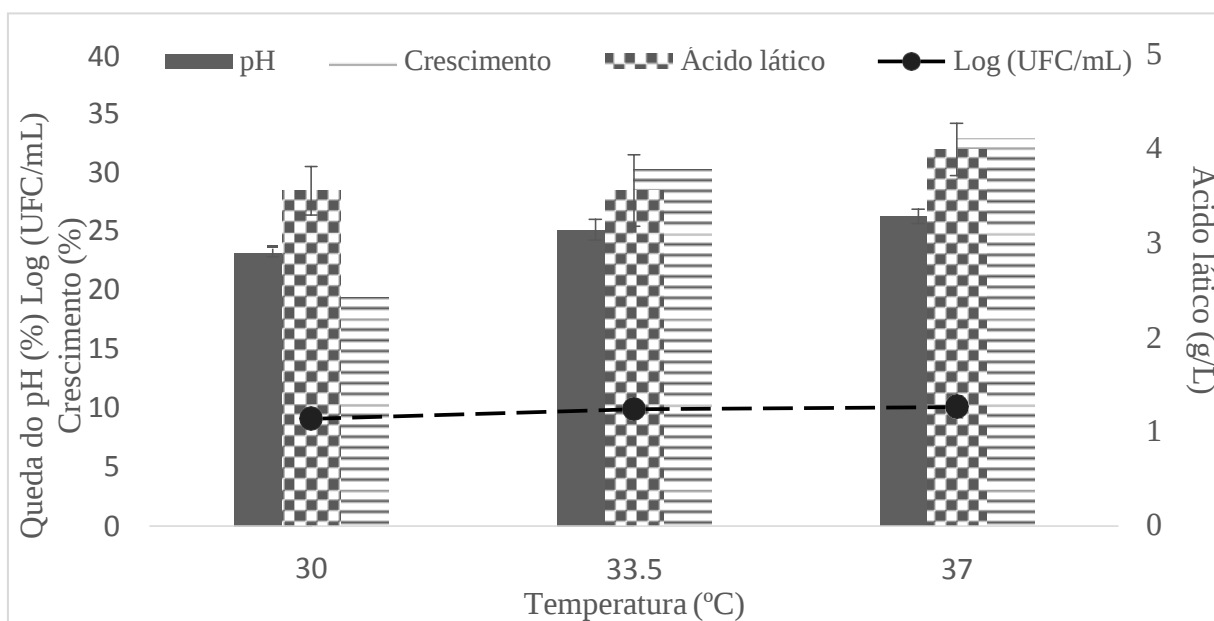


Figura 5.5 - Queda do pH, viabilidade *L. rhamnosus* ATCC 7469 (Log UFC.mL⁻¹), taxa de crescimento (%) e concentração de ácido láctico com três diferentes temperaturas e empregando-se 10% (V/V) de polpa e 1% (V/V) de inóculo por 12h.

Usualmente, as espécies de *Lactobacillus* são reportadas por apresentarem crescimento ótimo a 37°C e pH em torno de 6,5. Costa *et al.* (2013) e Fonteles *et al.* (2011) variando as concentrações de pH inicial nas fermentações de abacaxi e melão, respectivamente, observaram que as maiores viabilidades foram encontradas com o pH inicial em torno de 6,0, decaindo até 4,5 com 12 horas de fermentação. Estes resultados corroboram com os encontrados neste trabalho. A diminuição do pH não interferiu no aumento da viabilidade, pois a linhagem em estudo foi capaz de sobreviver em ambientes com pH próximo a 4,5 (SHEEHAN *et al.*, 2007). As concentrações celulares finais ficaram no limite estabelecido pela legislação.

Realização do Planejamento Composto Central Rotacional

Condições ótimas para o crescimento bacteriano foram investigadas usando o DCCR. Os ensaios foram realizados de acordo com a Tabela 5.4. A Figura 5.6 mostra os valores de pH, concentração de ART, concentração de ácido lático e viabilidade em Log (UFC.mL⁻¹) obtidos em cada um dos ensaios do planejamento. O pH inicial variou entre 5,5 e 6,1, de acordo com a concentração de inóculo adicionado. O coeficiente de variação foi de 1,6%. O gênero *Lactobacillus* é capaz de crescer em meios que vão de levemente ácidos a neutros. Pereira *et al.* (2011) encontraram um crescimento mais expressivo em pH 6,4. Para o *L. rhamnosus* ATCC 7469 em suco de Maracujá da Caatinga o pH 6,0 foi considerado ideal para seu crescimento. O pH final variou entre 4,6 e 5,5. O coeficiente de variação neste caso foi de 8,9%, indicando uma variação mais alta do que aquela apresentada antes da fermentação, o que mostra a dependência com as condições de cultivo.

De forma geral, um caldo fermentado com valor baixo de pH indica uma maior concentração de ácido lático. Assim como os antibióticos, os ácidos orgânicos de cadeia curta também apresentam uma atividade antimicrobiana específica, porém esta atividade depende do pH do meio. Chaveerach *et al.*, (2002) reportaram baixa atividade antimicrobiana em meio com pH 7,3, mas em meio com pH 4,0 todos os ácidos orgânicos apresentaram alguma atividade contra *Escherichia coli*.

A viabilidade foi maior que 8,0 Log (UFC.mL⁻¹) em todos os ensaios, chegando a 10,0 Log (UFC.mL⁻¹) nos ensaios 4 e 6. A concentração de inóculo variou entre 0,09 e 2,91% (V/V), contendo 5 e 6 Log (UFC.mL⁻¹), respectivamente. No ensaio com 0,09% V/V de inóculo a viabilidade aumentou em duas unidades, de 5,0 a 7,0 Log (UFC.mL⁻¹). Já o ensaio com 2,91% V/V, a viabilidade aumentou em três unidades, de 6,0 a 9,0 Log (UFC.mL⁻¹). A concentração de polpa variou entre 2,95% v/v (1,48 g.L⁻¹ de ART) e 17,05% v/v (8,53 g.L⁻¹ de ART). Nas corridas com 2,95% V/V ou 17,05% V/V de polpa, a viabilidade aumentou em três unidades, de 6,0 a 9,0 Log (UFC.mL⁻¹), em ambas as situações. Pode-se deduzir que a concentração de inóculo apresentou uma maior influência na viabilidade de *L. rhamnosus* que aquela apresentada pela concentração de polpa.

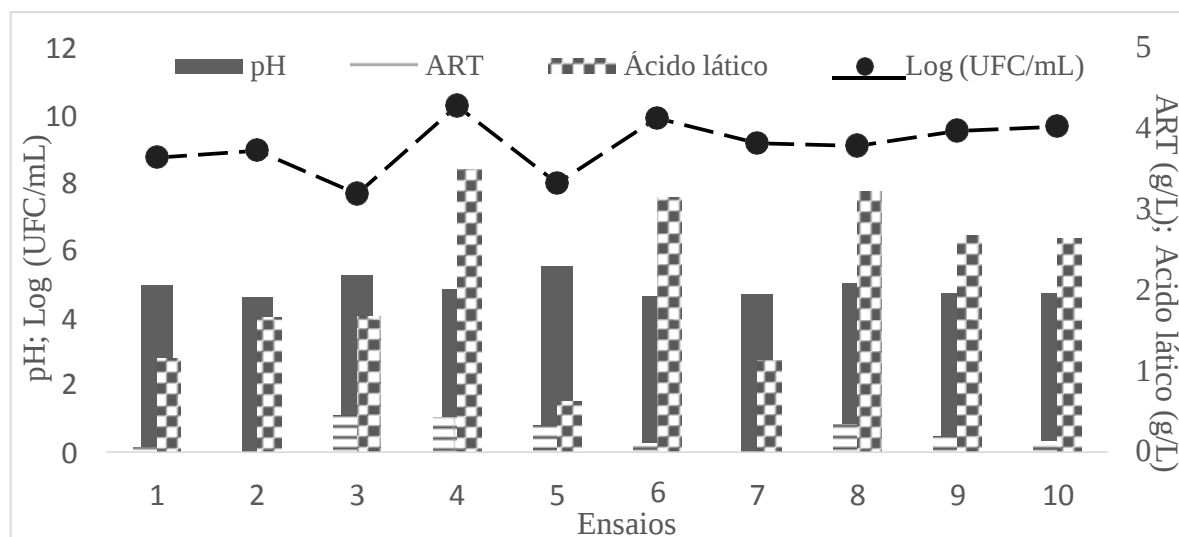


Figura 5.6 - Viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469, concentração de ART, pH e concentração de ácido lático após as fermentações nas condições do DCCR.

Tabela 5.4 - Modelo experimental do DCCR e as respostas obtidas

Ensaio	Inóculo (% V/V)	Polpa (% V/V)	RVpH	Ácido láctico (g.L ⁻¹)
1	0,5	5	1,77	1,73
2	2,5	5	1,95	2,52
3	0,5	15	1,46	2,51
4	2,5	15	2,13	5,27
5	0,09	10	1,45	0,95
6	2,91	10	2,14	4,74
7	1,5	2,95	1,96	1,70
8	1,5	17,05	1,82	4,84
9	1,5	10	2,05	4,04
10	1,5	10	2,17	3,98

No ensaio 4 (2,5 % V/V inóculo; 15 % V/V polpa), foram obtidas as maiores viabilidade e concentração de ácido láctico, além de um baixo valor de pH. Resultados similares foram obtidos no ensaio 10 (1,5 % V/V inóculo; 10 % V/V polpa). Um crescimento expressivo parece estar relacionado com uma alta produção de ácido láctico e consequente baixa no pH. O ensaio 5 resultou em um alto valor de pH, baixo crescimento e baixa produção de ácido láctico. A concentração de inóculo neste ensaio foi a mais baixa do planejamento. Para avaliar condições para o crescimento bacteriano combinado com a resistência a um ambiente ácido, as razões entre a viabilidade final e o pH final (RVpH) foram analisadas, ambos os valores obtidos após 24h de fermentação (Tabela 5.4). As maiores razões foram encontradas nos ensaios 4, 6, 9 e 10, nos quais baixos valores de pH foram encontrados. Em um ambiente ácido, os ácidos orgânicos tendem à não-dissociação, se encontrando, portanto, lipofílicos, podendo transpassar membranas celulares por difusão. Em ambientes com valores de pH mais altos, como se encontra o citoplasma das células, os ácidos se dissociam, aumentando a acidez do meio, desregulando reações enzimáticas e o sistema de transporte de nutriente (DIBNER & BUTIN, 2002).

Os *Lactobacillus* são micro-organismos exigentes, com sua viabilidade e seu crescimento influenciados por fatores como a formulação do meio, pH, temperatura e concentração de inóculo. Liew *et al.* (2005) otimizaram um meio a base de extrato de levedura, glicose e vitaminas para maximizar o crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Em condições ótimas, um valor de 9 Log (UFC.mL⁻¹) foi alcançado. Chang & Liew (2012) otimizaram um meio para a produção de biomassa de *L. rhamnosus* ATCC 7469. No ponto ótimo de formulação do meio a viabilidade ficou em 10 Log (UFC.mL⁻¹), com crescimento específico e produção de biomassa mais altos que em meio MRS. Nos dois estudos, meio a base de extrato de levedura foram usados.

Um modelo quadrático foi usado para estabelecer a RVpH. A Equação 3 foi ajustada aos resultados experimentais. O nível de significância do modelo foi avaliado pelo Teste-F, o qual revelou que a regressão foi estatisticamente significativa (Tabela 5.5). A razão entre a média quadrática (MQ) da regressão e a MQ residual deve ser pelo menos dez vezes maior ($F_{\text{calc}} = 146,75$) que o Teste-F tabelado para 95% de confiança ($F_{\text{tab}} = 6,26$). Por outro lado, a razão entre a MQ por falta de ajuste e a MQ pelo erro puro deve ser no mínimo cinco vezes menor ($F_{\text{calc}} = 10$) que o Teste-F tabelado para 95% de confiança ($F_{\text{tab}} = 215,7$). As MQ são calculadas pela razão entre as somas quadráticas (SQ) e os graus de liberdade (GL). O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,9943, que mostrou que o modelo foi adequado para representar a relação entre as variáveis escolhidas. A equação polinomial de segunda ordem para a razão entre a viabilidade (Log UFC.mL⁻¹) e o pH está representada pela Equação 5:

$$\hat{y} = 2.03 + 0.23x_1 - 0.04x_2 - 0.12x_1^2 - 0.8x_2^2 + 0.1x_1x_2 \quad \text{Eq. (5)}$$

Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático polinomial

RVpH				Ácido láctico (g/L)			
Variável	SQ	GL	MQ	Variável	SQ	GL	MQ
x_1	0,4189	1	0,4189	x_1	9,8541	1	9,8541
x_1^2	0,0667	1	0,0667	x_1^2	1,6210	1	1,6210
x_2	0,0129	1	0,0129	x_2	8,0112	1	8,0112
x_2^2	0,0264	1	0,0264	x_2^2	0,6650	1	0,6650
x_1x_2	0,0622	1	0,0622	x_1x_2	0,9739	1	0,9739
Falta de Ajuste	0,0031	3	0,0010	Falta de Ajuste	0,5266	3	0,1755
Erro puro	0,0001	1	0,0001	Erro puro	0,0021	1	0,0021

A superfície de resposta que mostra o comportamento das razões entre o Log UFC.mL⁻¹ e o pH em função das variáveis independentes (concentrações de inóculo e polpa), está representada pela Figura 5.7. Um aumento na concentração de inóculo resultou em um aumento na razão, sendo assim, foram obtidos maiores crescimentos e menores valores de pH, sendo encontrados também maiores valores para as concentrações de ácido láctico. Por outro lado, um aumento na concentração de polpa resultou numa diminuição no valor de RVpH. O efeito da concentração de polpa na razão estudada pode ser avaliado no modelo como coeficiente linear de x_2 (concentração de polpa), já que foi negativo. Em contra partida, esse efeito não foi significativo de acordo com o Teste-T (95% de confiança).

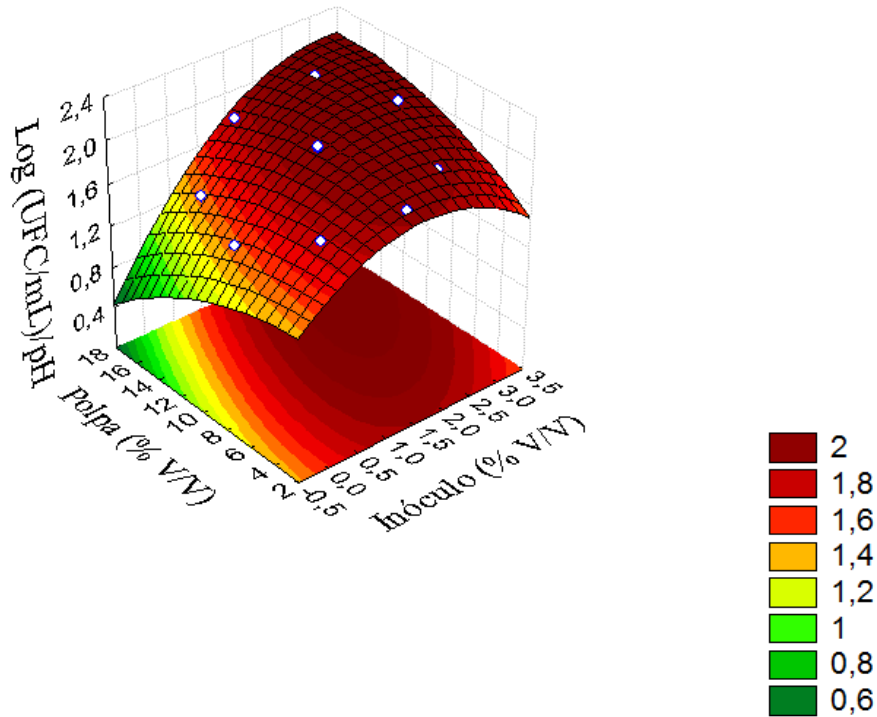


Figura 5.7 - Superfície de resposta obtida para a RVpH em função das concentrações de polpa e de inóculo utilizadas nas fermentações do suco realizadas pelo *L. rhamnosus* ATCC 7469.

O Statistica determinou as concentrações das variáveis investigadas, que permitiriam a obtenção da maior RVpH. Essas concentrações foram 2,91% V/V de inóculo e 14,45% V/V de polpa. Para validar o modelo, uma cinética foi realizada com essas condições de cultivo.

Um modelo quadrático foi também utilizado para a concentração de ácido lático produzido nos ensaios. O seu coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9749. A análise de variância mostrou que o modelo foi capaz de representar uma relação com as variáveis estudadas (Tabela 5.5). A equação polinomial de segundo grau para a concentração de ácido lático está representada na Equação 6.

$$\hat{y} = 4.01 + 1.11x_1 + 1.00x_2 - 0.59x_1^2 - 0.38x_2^2 + 0.4x_1x_2 \quad \text{Eq. (6)}$$

A superfície de resposta que representa a concentração de ácido láctico em função das variáveis independentes (concentração de inóculo e concentração de polpa) está representada na Figura 5.8.

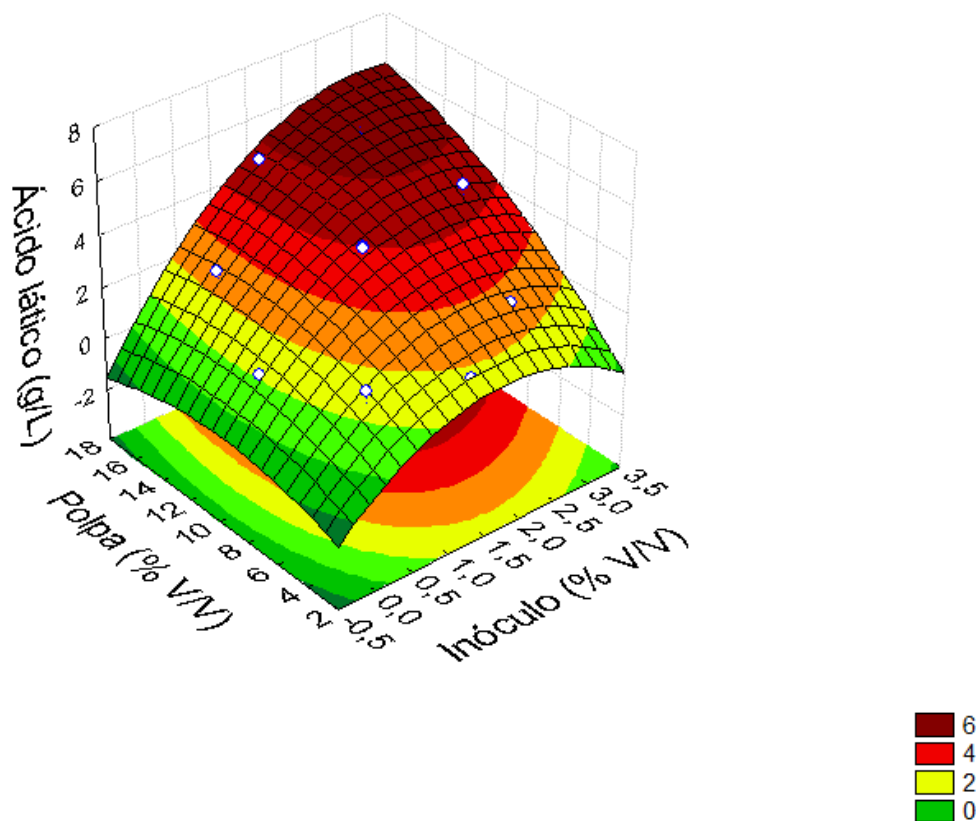


Figura 5.8 - Superfície de resposta obtida para a concentração de ácido láctico em função das concentrações de polpa e de inóculo utilizadas nas fermentações do suco realizadas pelo *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Quanto maiores foram as concentrações de polpa e de inóculo, maior foi a concentração de ácido láctico. Todos os efeitos das variáveis na concentração de ácido láctico foram significativas de acordo com o Teste-T (95% de confiança). Novamente, derivando-se o modelo quadrático em função de cada uma das variáveis, e igualando o resultado a zero, foi possível descobrir que as condições de cultivo para uma máxima produção de ácido láctico, foram com uma combinação de 3,52% v/v de inóculo e 23,08% v/v de polpa.

Estudo cinético usando as melhores condições preditas pelo DCCR para uma maior RVpH

Nas melhores condições de fermentação (2,91% V/V de inóculo e 14,45% V/V de polpa), um rápido crescimento foi observado (Figura 5.9). Após 20h, a concentração de colônias viáveis chegou a 10 Log UFC.mL⁻¹. A máxima velocidade específica de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$ foi de 0,25 h⁻¹. O valor máximo para RVpH foi de 2,19, obtido após 20 h de fermentação. Este valor está muito próximo do previsto pelo modelo matemático (2,17).

Chang & Liew (2012) acharam 10 Log após 20h de fermentação em meio à base de extrato de levedura utilizando o *Lactobacillus rhamnosus*. Em outro estudo, Sharma & Mishra (2014) obtiveram um aumento de 5 Log para 7 Log após 24h de fermentação em suco de vegetais pelo *L. plantarum* NCDC 414, e $\mu_{\text{máx}}$ foi de 0,45 h⁻¹.

Durante a fermentação, a produção de ácido láctico parece correr paralelamente ao crescimento microbiano. Uma produção significativa ocorreu tanto na fase de crescimento quanto na fase estacionária. Uma produção desatrelada de ácido láctico pelo *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi claramente observada apesar do crescimento microbiano já haver cessado. Sendo assim, foi possível descobrir uma relação linear entre o crescimento e a produção de ácido láctico desde o início da fermentação até 20h ($R^2 = 0,9745$), ou seja, antes da fase estacionária. Resultados similares foram obtidos por Sharma & Mishra (2014), com fermentação em sucos realizada por *L. plantarum* NCDC 414.

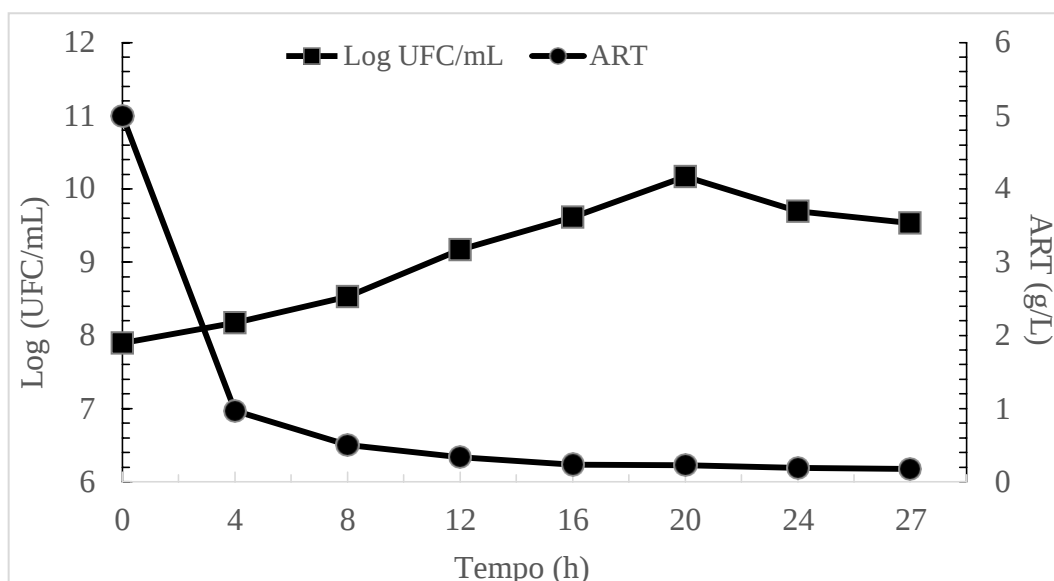


Figura 5.9 - Viabilidade do *L. rhamnosus* ATCC 7469 e concentração de ART durante a fermentação do suco.

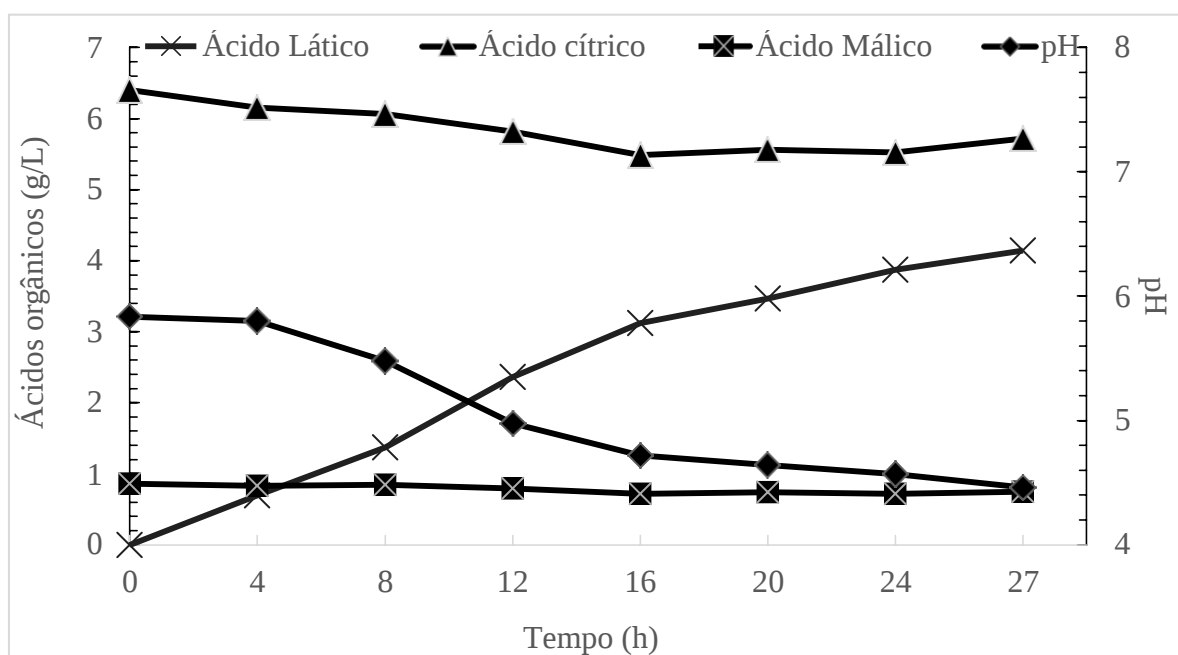


Figura 5.10 - Concentração de ácidos orgânicos e pH durante a fermentação do suco.

A concentração de ART foi praticamente zerada após 16h de fermentação. A máxima produção de ácido lático foi obtida após 27h (Figura 5.10). O pH diminuiu devido a produção de ácido lático, sendo o valor mais baixo 4,5. Os ácidos cítrico e málico se mantiveram constantes em $5,81 \pm 0,26 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,78 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Análise de Estoque e Sobrevivência à Simulação das Condições Gastrointestinais

A viabilidade de micro-organismos probióticos incorporados em alimentos deve ser mantida durante seu estoque e ser capaz de sobreviver ao trato gastrointestinal de quem os consome (SANZ, 2007). A Figura 5.11 mostra a viabilidade do *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o estoque a 4°C. Os valores de pH, viabilidade e concentração de ácido láctico se mantiveram constantes em $4,4 \pm 0,2$, $10,5 \pm 0,5$ e $6,2 \pm 0,5$, respectivamente. A legislação atual que trata sobre o número mínimo de micro-organismos viáveis em produtos probióticos deve estar situada entre 8 e 9 Log UFC pela dosagem diária do produto (ANVISA, 2003, 2008). Durante a fermentação, todo o açúcar do meio foi consumido, e mesmo aquele adicionado após a fermentação (14 g.L^{-1}) foi pouco aproveitado pelo micro-organismo durante o estoque, dessa forma, houve pouca variação na concentração de ácido láctico, consequentemente não houve queda no valor do pH.

Ellendersen *et al.* (2012) estocaram suco de maçã fermentado pelo *Lactobacillus casei* por 28 dias a 7°C e também não reportaram crescimento da cepa durante o estoque, mantendo-se $8,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$. O *L. acidophilus* mostrou-se viável em leite de soja fermentado adicionado com 15% de suco de maçã em estoque de 21 dias, se mantendo em $9,0 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ após 21 dias de estoque refrigerado, em meio onde o pH e a acidez titulável se manteve estável (IÇIER *et al.*, 2015).

Pakbin *et al.* (2014) observaram que a manutenção da viabilidade celular não depende apenas do meio de fermentação, mas também da cepa do micro-organismo utilizado. Em seus estudos com fermentado de suco de pera foram utilizadas três micro-organismos diferentes *L. plantarum*, o *L. casei* e o *L. delbrueckii*, que fermentaram separadamente o suco. Durante o estoque do fermentado sob refrigeração, o *L. casei* perdeu viabilidade após 14 dias de estoque, enquanto que o *L. plantarum* apresentou uma queda de $3 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ e o *L. delbrueckii* apresentou queda de $2 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, após 28 dias de estoque.

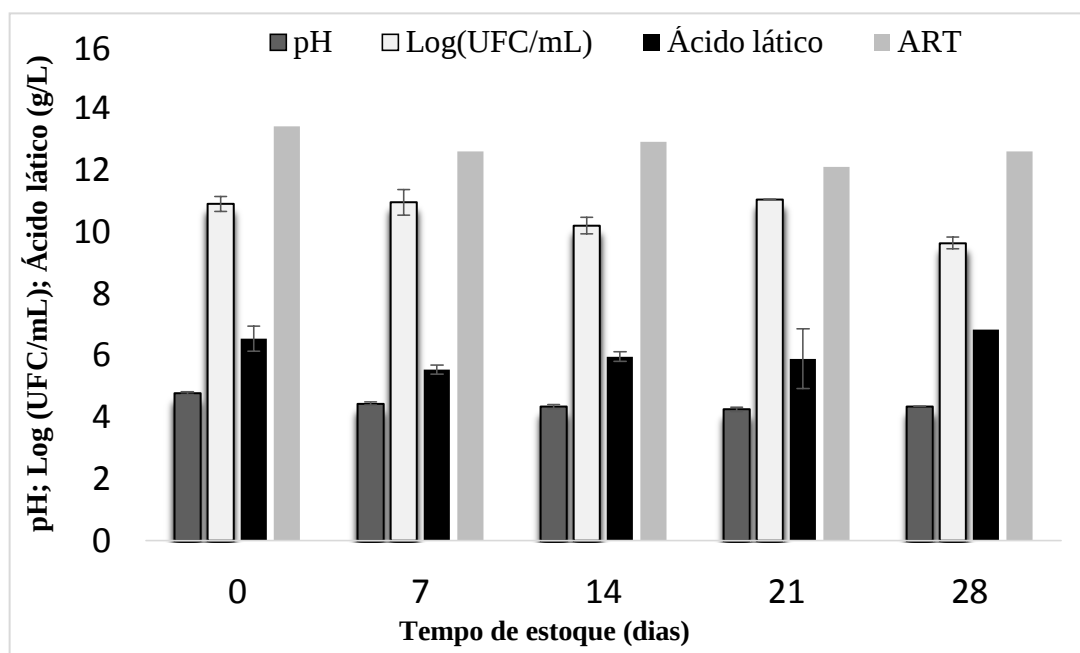


Figura 5.11 Sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469, pH, concentração de ácido láctico e de ART no suco fermentado durante o estoque.

Para poder sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal, a bactéria probiótica deve ser capaz de tolerar o baixo pH estomacal (pH 2,5 – 3,5) (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). Não houve sobrevivência do lactobacillus em pH 2,0 e 2,5. Por outro lado, o micro-organismo se manteve viável (9 Log) após simulação gástrica, em pH 2,7 (Figura 5.12).

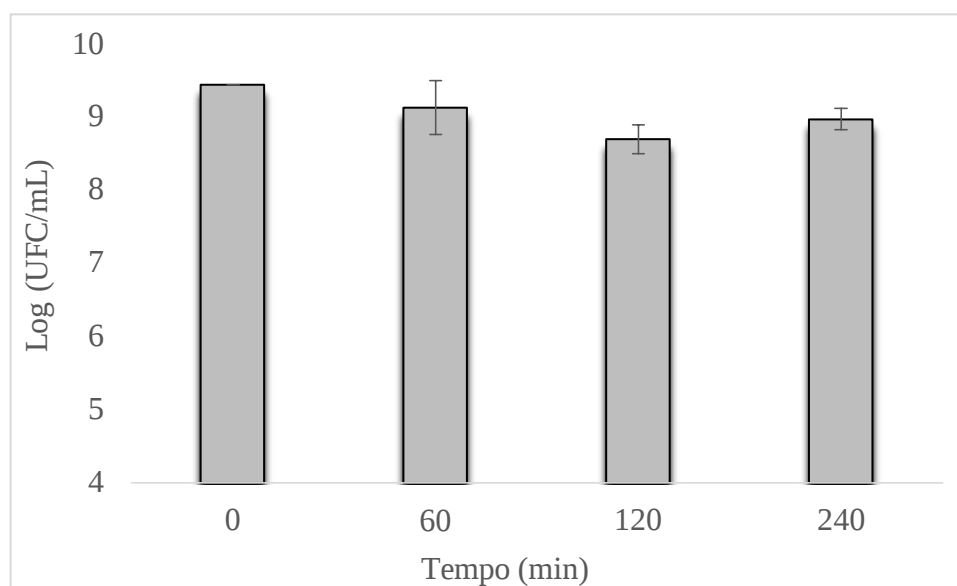


Figura 5.12 Sobrevivência do *L. rhamnosus* ATCC 7469 com 28 dias de estoque após exposição de simulação gástrica *in vitro* (60 e 120 minutos) e entérica *in vitro* (240 minutos).

Gerez *et al.* (2011) trabalharam com *L. rhamnosus* CRL 1505, e observaram uma viabilidade abaixo de 2 Log UFC.mL⁻¹ após 120 minutos em simulação de suco gástrico (pH 2,0), estando esse resultado de acordo com o presente trabalho, onde a bactéria não tolerou pH abaixo de 2,5. Exposto a condições simuladas do trato gastrointestinal, o *L. acidophilus* La5 apresentou uma queda de 8,5 a 7,8 Log UFC.mL⁻¹ em pH 3,0 por 120 minutos, e de 7,8 a 4,9 Log UFC.mL⁻¹ em pH 7,0 por 300 minutos (GEBARA *et al.*, 2013). A resistência a condições gastrointestinais varia de cepa a cepa, e apenas as resistentes poderão ser utilizadas como micro-organismos probióticos. Sempre que um novo probiótico estiver sendo testado, é preciso submetê-lo a simulação gastrointestinal (SHEEHAN *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES

O método proposto e validado para a análise dos ácidos cítrico, málico e láctico em amostras de suco e fermentado por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão iônica, se mostrou adequado. Boas seletividade, linearidade, precisão, acurácia e robustez foram apresentadas.

O suco de maracujá da Caatinga se mostrou ideal à fermentação pelo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, que apresentou uma alta viabilidade nas condições otimizadas. Além disso, o micro-organismo foi capaz de se manter viável em ambiente ácido, ideal para inibir a proliferação de patógenos, tendo produzido ácido láctico em quantidades significativas, e para isto não foi necessária nenhuma adição de açúcares, tendo sido usados apenas aqueles presentes naturalmente na polpa.

Os ensaios preliminares foram importantes para conhecer o sistema com o qual se está trabalhando, quando sobre ele não se tinha nenhuma referência. A partir dos resultados obtidos, foi possível fazer um planejamento estatístico, com uma boa faixa de trabalho das variáveis escolhidas, concentração de inóculo e de polpa. Dependendo do fator que se queira otimizar, serão obtidas diferentes combinações de variáveis. No caso estudado, as concentrações de inóculo para a RVpH e para a produção de ácido láctico foram próximas, no entanto, as concentrações de polpa foram diferentes, sendo necessária uma maior quantidade para uma alta produção do ácido.

Após a otimização do meio de fermentação, foi realizada a cinética de crescimento e consumo e produção de componentes do meio. Com 20h de fermentação foi obtido o maior valor para a viabilidade celular e uma concentração significativa de ácido láctico. Já no estudo de estoque o fermentado foi capaz de se manter estável por até 28 dias. A resistência da cepa também pôde ser comprovada pela simulação gastrointestinal, a qual mostrou que em presença de pepsina com pH a partir de 2,7 o *L. rhamnosus* manteve sua viabilidade, mesmo após simulação intestinal com pancreatina.

Os resultados obtidos nesse estudo fornecem uma boa base para outros que partam para a produção do probiótico comercializável. Sabendo-se as combinações de fatores que fornecem o máximo de determinada resposta, é possível fermentar nas combinações ideais, mas com concentrações diferentes, para, por exemplo, obter um produto com boa aceitabilidade dos consumidores.

6. REFERÊNCIAS

AZOUBEL, P. M., Araújo, A. J. de B., de Oliveira, S. B., Amorim, M. da R. Restructuring *Passiflora cincinnata* fruit pulp: influence of hydrocolloids. Estruturação de polpa de *Passiflora cincinnata*: influência de hidrocoloides. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 31(1): 160-166, 2011.

AZOUBEL, P. M., Araújo, A. J., Oliveira, S. B., Amorim, M., Oliveira, S. S. B. Processo agroindustrial: aproveitamento da polpa de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) para a fabricação de estruturado de frutas – **Comunicado Técnico Online 143** - ISSN 1808-9984 Petrolina, PE, 2010.

BADARÓ, A., Guttierres, A., Rezende, A., Stringueta, P. C. Alimentos Probióticos: Aplicações Como Promotores Da Saúde Humana – Parte 1. **Nutrir Gerais, Revista Digital de Nutrição**. V. 2, N. 3, 2008.

BERRY, C. Functional Foods. **Q J Med - Biologic**, 95, 639-640, 2002.

BERISTAIN-BAUZA, S. C., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control** 62, 44–51, 2016.

BISCHOFF, S.C. Gut healthy: a new objective in medicine? **BMC Medicine** .9-24, 2011

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, **Resolução nº 18**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, abril de 1999. ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, julho de 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N.º 2, de 7 de Janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br).

BRASIL (2003, 12/26). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 359, de 23/12/2003**. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br).

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa Nº01/2000**. Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BROWN, A. C., Shovic, A., Ibrahim, S., Hoick, P., Huang, A. A Non-Dairy Probiotic's (Poi) Influence On Changing The Gastrointestinal Tract's Microflora Environment. **Alternative Therapies**. V.11, Nº1, 2005.

CAETANO, P. K., Daiuto, E. R., Vieites, R. L. Característica físico-química e sensorial de geleia elaborada com polpa e suco de acerola. **Brazilian Journal of food technology**, v. 15, n. 3, p. 191-197, 2012.

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

CHAMPAGNE, C.P., Gardner, N.J. Effect of Storage in a Fruit Drink on Subsequent Survival of Probiotic Lactobacilli to Gastrointestinal Stresses. **Food Res. Int.** v. 41,n.5, 539–543, 2008.

CHAMPAGNE, C.P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barette, J. and Buckley, N. Selection of Probiotic Bacteria for the Fermentation of a Soy Beverage in Combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Res. Int.** v. 42, 612–621, 2009.

CHANG, C. P., Liew, S. L. Growth Medium Optimization for Biomass Production of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469. **Journal of Food Biochemistry**. V.37, 536–543, 2013.

COELHO, J. C. **Elaboração de Bebida Probiótica a Partir do Suco de Laranja Fermentado com *Lactobacillus casei***. Dissertação de Mestrado. Fortaleza, CE: UFCE, 2009. 90p.

COSTA, M. G. M., Fonteles, T. V., Tibério de Jesus, A. L., Rodrigues, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chem.** V.139, 261–266, 2013.

CHINNICI, F., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**. V.18, 121-130, 2005.

DE MAN, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **J. Appl Bacteriol.** V.23, 130–135. 1960.

DAWOOD, M. A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M. F., Hossain, Md. S., Nhu, T. H., Dossou, S., Moss, A. S. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish and Shellfish Immunology**. Accepted Manuscript. 2016

DIBNER, J. J., Buttin, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Poultry Science Association, Inc.** 2002.

ELLENDERSEN, L. de S., N., Granato, D., Guergoletto, K., B., Wosiacki, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Eng. Life Sci.**, 12, 4, 475-485, 2012.

FAO/WHO. Probiotics in Food, Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. **World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations.** Roma, 2006.

FARR. Functional foods. **Cancer Letters.** V. 114 1997, 59-63, 1997.

FIGUEROA-GONZÁLES, I., Quijano, G., Ramírez, G., Cruz-Guerrero, A. Probiotics and Prebiotics-Perspectives and Challenges. **J Sci Food Agric.** 91, 1341-1348, 2011.

FONTELES, T.V., Costa, M.G.M., Tibério de Jesus, A.L., Rodrigues, S. Optimization of the Fermentation of Cantaloupe Juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food Bioprocess Technology.** 5; 7 2819-2826, 2011.

FRIC P. Probiotics and Prebiotics – Renaissance of a Therapeutic Principle. **CentEur J Med** 2, 237–270, 2007.

GEBARA C., Chaves K. S., Ribeiro, M. C. E., , Souza, F. N., Grosso C. R. F., Gigante, M. L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, 51, 872–878, 2013.

GEREZ, C.L., Font de Valdez, G., Gigante, M.L., Grosso, C.R.F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology** 552-556 (2011)

IÇIER, F., Gündüz, G. T., Yilmaz, B., Memeli, Z. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, 63,57-64, 2015.

KLIGLER, B., Cohrsen, A. Probiotics. **American Family Physician**.V.78, n. 9, 2008.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Ed. Átomo,384 p.2009.

LI, G. Gram-positive bacteria Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol. **Procedia Environmental Sciences** 12, 1180 – 1186, 2012.

LIEW, S.L., Ariff, A.B., Raha, A.R. and Ho, Y.W. Optimization of Medium Composition for the Production of a Probiotic Microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, Using Response Surface Methodology.**Int. J. Food Microbiol.** V.102, 137–142, 2005.

MARSHA, A. J., Hill, C., Rossa, R. P., Cottera, P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**. 38, 113-124, 2014.

MATTIETTO, R. A., Matta, V. M. **Utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional para Avaliação Microbiológica de Polpas de Açaí Pasteurizadas – XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – ISSN 2178-3659 2012**

MENDES, D. P. G. **Características Físico-Químicas e Microbiológicas e Aceitação Sensorial de Leites Fermentados por Bactérias Produtoras de Ácido Lático Isoladas de Queijo Coalho de Pernambuco – Dissertação de Mestrado**. Belo Horizonte, MG: UFMG. 2011. 63p.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do Delineamento Composto Central em Experimentos com Alto Coeficiente de Variação**. Dissertação de Mestrado. Viçosa, MG. 2012.

MILAGRES, M.P., Brandão, S. C. C., Magalhães, M. A., Minim, V. P. R., Minim, L. A. Development and validation of the high performance liquid chromatography–ion exclusion method for detection of lactic acid in milk. **Food Chemistry**. V.135, 1078–1082, 2012.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.** V.31, 426–428, 1959.

NAZARRO, F., Fratianni, F., Sada, A., & Orlando, P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. **Journal of Science of Food and Agriculture**. V.88, 2271–2276, 2008.

OLIVEIRA Jr., M. X. **Caracterização dos Frutos do Maracujazeiro do Mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) e Superação de Dormência de Sementes** - Dissertação de Mestrado. Vitória da Conquista, BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2008. 61p.

PAKBIN, B., Razavi, S. H., Mahmoudi, R., Gajarbeygi, P. Producing Probiotic Peach Juice; **Biotech Health Sci**. 1(3): e24683. 2014

PANDEY, S. M., Mishra, H., N. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. **LWT -Food Science and Technology**, 62, 458-467, 2015.

PARREIRA, D. I. S. **Validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para doseamento da vitamina D em géneros alimentícios. Aplicação do método em diferentes matrizes alimentares** – Dissertação de Mestrado. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. 2013. 99p.

PEREIRA, A.L.F., Almeida, F.D.L., Tibério de Jesus, A.L., Costa, J.M.C., Rodrigues, S. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food Bioprocess Technol**. V.6, 3155–3165, 2013.

PEREIRA, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Res Inter.** 44, 1276–1283, 2011.

PEREIRA, E.P.R., Faria, J.A.F., Cavalcanti, R.N., Garcia, R.K.A., Silva, R., Esmerino, E.A., Cappato, L.P., Arellano, D.B., Raices, R.S.L., Silva, M.C., Padilha, M.C., Meireles, M.A., Bolini, H.M.A., Cruz, A.G. Oxidative stress in probiotic petit suisse: Is the jabuticaba skin extract a potential option? **Food Research International**. Accepted Manuscript. 2016.

PEREIRA, V. G., Gomez, R. J. H. C., Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências Agrárias, Londrina**. V.28, n. 2, 229-240, abr./jun. 2007.

PERÁZIO, B. A. A. **Efeitos dos pontos axiais e centrais sobre a eficiência do delineamento composto central**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2010.

PITA, J. S. L. **Physico-chemical and nutritional characterization of the pulp and flour passion fruit peel the bush and yellow**. Dissertation (PhD in Food Engineering), Department of Food Engineering - University of Southwest Bahia, 28-36.2012.

PUERARI, C., Teixeira, K., Guedes, M., Schwan, R. F. Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. **Food Microbiology**. V.46, 210-217, 2015.

PRADO, F. C., Lindner, J. De D., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Brar, S. K., Soccol, C. R. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**. V.12, 489–497, 2015.

RAKIN, M., Vukasinovic, M., Siler, S., Marinkovic, S. Contribution of Lactic Acid Fermentation to Improved Nutritive Quality Vegetable Juices Enriched With Brewer's Yeast Autolysate. **Food Chemistry**. V.100, 599–602, 2007.

RANADHEERA, C. S., Evans, C. A., Adams, M.C., Baines, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, 49, 619-625, 2012.

RATHORE, S., Salmerón, I., Pandiella, S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria. **Food Microbiology**.V.30, 239-244, 2012.

REALE, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziusa M., Parente, E., Sorrentino, E., Coppola, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology** 60, 721-728, 2015.

TANG, R. B., Chang, J. K., Chen, H. L. Can probiotics be used to treat allergic diseases? **Journal of the Chinese Medical Association**.V.78, 154-157, 2015.

SALMERÓN, I., Thomaz, K., Pandiella, S. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. **Journal of Functional Foods**. V.15, 106–115, 2015.

SANTOS, J. L., Matsumoto, S. N., D'Arêde, L. O., Da Luz, I. S., Viana, A. E. S. Propagação Vegetativa de Estacas de *Passiflora cincinnata* MAST. em Diferentes Recipientes e Substratos Comerciais. **Rev. Bras. Frutic.**,v. 34, n. 2, p. 581-588, 2012.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus Casei* por Spray Drying**. Dissertação de Mestrado. Recife, PE: UFPE, 105p. 2013.

SCHERER, R., Rybka, A. C. P., Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Teixeira Filho, J., Godoy, H. D. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruit juices. **Food Chemistry**. V.135, 150–154, 2012.

SCHILLINGER, U. Isolation and Identification of Lactobacilli from Novel-Type Probiotic and Mild Yoghurts and Their Stability During Refrigerated Storage. **International Journal of Food Microbiology** V.47, 79– 87. 1999.

SEQUEIRA, C. B. **Analysis of sugars and organic acids in commercial juices : application of HPLC -SEC -UV -IR and electronic language**. Dissertation (PhD in Food Quality and Safety), Polytechnic Institute of Bragança.2012.

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, 279-284, 2007.

SILVA, T. L., Marques, S., Alves, L., Roseiro, J. C. The simultaneous utilization of kinetic analysis and flow cytometry in the assessment of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 physiological states produced by increasing oxygen limitation levels and lactic acid accumulation. **Biochemical Engineering Journal**.V.74, 54– 59, 2013.

SILVEIRA, M.S., Fontes, C. P. M. L., Guilherme, A.A., Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S. Cashew Apple Juice as Substrate for Lactic Acid Production. **Food Bioprocess Technol.** DOI 10.1007/s11947-010-0382-9. 2010.

SIEGRIST, M., Stampfli, N., Kastenholtz, H. Consumers' willingness to Buy Functional Foods. The Influence of Carrier, Benefit and Trust. **Appetite**, 51, 526-529, 2008.

SOUZA, A., Rodrigues, L., Araújo, A., Santos, J., Silva, I., Araújo, F. **Elaboração, Aceitabilidade e Intenção de Compra de Iogurte Saborizado com Polpa de Maracujá do Mato**. Projeto apresentado no VIII CONNEPI, Salvador, BA. 2013

STONE, H.; Sidel, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. 2^o ed. Academic Press, Inc. 338.1992.

VASILJEVIC, T., Shah N.P. Probiotics – From Metchnikoff to Bioactives. **Int Dairy J** V.18, 714–728, 2008.

VANDENPLASA, Y., Huysbe, G., Daube, G. Probiotics: an update. **J. Pediatr.** 91(1):6---21. 2015.

WALZEM, R. L. Functional Foods. **Trends in Food Science and Technology**; 15, 518, 2004.

WU, Y., Wu, W., Hung, C., Ku, M., Liao, P., Sun, H., Lu, K., Sheua, J., Lue, K. Evaluation of efficacy and safety of *Lactobacillus rhamnosus* in children aged 4-48 months with atopic dermatitis: An 8-week, double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**.1-9, 2015.

YÁÑEZ, R., Marques, S., Gírio, F. M., Roseiro, J. C. The Effect of Acid Stress on Lactate Production and Growth Kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* Cultures. **Proc. Biochem**.V.43, 356–361, 2008.

ZHU, Y., Luo, T. M., Young, H. A., Jobin, C. Gut and probiotics in colon tumorigenesis. **Cancer Letters**.V.309, 119–127,2011.

ZENEBON O, Pascuet, N. S., Tiglea, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz – SP. p. 1020. 2008.

ZERAIK, M. L., Pereira, C. A. M., Zuin, V. G., & Yariwake, J. H. Passion fruit: is a functional food? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**.V.20, 459-471, 2010.

Accepted Manuscript

Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design

Natalie Farias, Mariana Soares, Ester Gouveia



PII: S0023-6438(16)30151-7

DOI: [10.1016/j.lwt.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.014)

Reference: YFSTL 5354

To appear in: *LWT - Food Science and Technology*

Received Date: 10 November 2015

Revised Date: 6 March 2016

Accepted Date: 9 March 2016

Please cite this article as: 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* (2016), doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.014.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion
fruit juice: application of a central composite rotatable design**

Natalie Farias, Mariana Soares and Ester Gouveia*

Department of Antibiotics – Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária –

CEP: 50670-901 – Recife – PE – Brazil; [*estergouveia@gmail.com](mailto:estergouveia@gmail.com)

Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: application of a central composite rotatable design

Abstract

A central composite rotatable design was employed to investigate the combined effects of inoculum concentration (0.09–2.91% V/V), and passion fruit from a Caatinga pulp concentration (2.95–17.05% V/V) on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in relation to pH. A second-order polynomial response surface equation revealed that the experimental variables significantly affected the studied response (ratio between the viability and the pH - RVpH). The determination coefficient (R^2) and the cross-validated R^2 (Q^2) were higher than 0.99. The conditions predicted by second-order polynomial model for the higher RVpH in the levels investigated were 2.91% V/V and 14.45 % V/V of inoculum and passion fruit pulp concentration, respectively. Under these conditions, viability was higher than 10 Log CFU/mL and the pH lower than 4.6. Higher RVpH indicates that the microorganism is better adapted to stress in the gastrointestinal tract. Fermented passion fruit from Caatinga juice was considered “probiotic” with a shelf life of 28 days.

Key-words: Kinetics, Non-dairy, Lactic acid, Lactic Acid Bacteria, Model mathematical

1. Introduction

The development of non-dairy probiotic products, including food matrices based on fruit, vegetables and cereals, has been widely studied due to an increase in the number of individuals with lactose intolerance (Ranadheera et al., 2010; Pereira et al., 2011; Mousavi et al., 2011; Fonteles et al., 2011; Peres et al., 2012; Martins et al., 2013; Costa et al., 2013). Fruit juices are an ideal means for probiotic culture vehicles due to the presence of carbohydrates (Rakin et al., 2007), are consumed regularly, and contain minerals, vitamins, dietary fibers, and antioxidants (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

Lactic Acid Bacteria (LAB) of the strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* are commonly used in the formulation of new vegetable probiotic products (Martins et al., 2013). The antimicrobial properties of LAB can be attributed to both the competition for nutrients and the production of inhibitory compounds such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

Lactobacillus rhamnosus is one of the most widely used probiotic microorganisms and has been used in commercial fruit drinks (Champagne and Gardner, 2008). *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 possess protective activity against *Escherichia coli* infection (Saito et al. 1980) and possess uropathogen growth on silicone rubber after incubation in urine (Velreads et al. 2000).

The passion fruit species belongs to the *Passifloraceae* family, which is mostly native to Latin America (Oliveira et al., 2014). Passion fruit from Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) contains about 8% reducing sugars and 1% protein and can be found

in the northeastern region of Brazil. It is resistant to drought and also to a number of pests that affect the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Passion fruit from Caatinga is widely known for its medicinal properties, in particular for having soothing and calming effect. It is a rich source of potassium, iron, phosphorus, calcium and vitamins A, C and B complex (Araújo et al., 2002).

Cultivation conditions of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit from Caatinga juice, as well as, the survivability of these LAB in fermented juice during refrigerated storage (4 °C) for 28 days, were studied. A central composite rotatable design was employed to investigate the combined effects of inoculum concentration and passion fruit pulp concentration on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in relation to pH. Viable cells, lactic acid, total reducing sugar concentrations and pH of the probiotic juice were determined during the kinetic study of the fermentation and storage. Viability of probiotic when exposed to conditions that simulate the passage through the gastro intestinal tract also was measured.

2. Material and Methods

2.1 Passion Fruit

Passion fruit from Caatinga (*Passiflora cincinnata*) was provided by the Brazilian Agriculture Research Company – EMBRAPA, in the city of Petrolina (Brazil). The fruit had its pulp extracted using a stainless steel knife to cut the fruit, and a sieve to separate the seeds. The pulp was conserved in a freezer at -20°C. The pulp contained the following characteristics: 3.12 pH; 11.5 total soluble solid level; 50 g/L total reduced sugar (TRS); 1.2 g N/100g pulp; 46 g/L citric acid and 8.5 g/L malic acid.

2.2 Microorganism

Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 was used. Commercial culture, freeze-dried, was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA). The culture was rehydrated into 100 mL of MRS broth (MERCK, KGaA Germany) and incubated for 24 h at 37°C. Afterwards, the fresh MRS-grown culture was inoculated in inclined tubes with MRS-agar (MERCK, KGaA Germany) and re-incubated for 37°C at 24 h. Batches of culture were then prepared by mixing the fresh MRS-grown culture in a medium composed of 100 g/L glucose (DINÂMICA, São Paulo, Brasil) and 10 g/L gelatin and then distributed (2 mL) in vials for lyophilization process. The lyophilized suspensions were stored at 4°C until use.

2.3 Fermentations of Passion Fruit Juice

Initially, three different concentrations (0.1, 1.0 and 5.0 % V/V) of bacterial suspensions, obtained after fermentations in MRS broth (37 °C for 24 h), were inoculated into media of the passion fruit juice (10 % V/V pulp). The fermentations were carried out in tubes containing 15 mL juice, which had been clarified using a vacuum filtration apparatus in qualitative filter-paper and then pasteurized at 65°C for 35 min. The fermentations were performed in duplicate, at 30°C, in a BOD incubator (SL200/120, Solab). The initial pH of the juice was adjusted, with a potentiationmeter (3510, Jenway), to 6.0 com NaOH 1M. In relation to temperature, fermentations at 30°C, 33.5°C and 37°C were carried out, using the same conditions as the inoculum

concentration. Viability, pH, and total reducing sugar were analyzed. All experiments were performed in duplicate.

2.4 Central Composite Rotatable Design

A central composite rotatable design was used. For the two variables (inoculum concentration and pulp concentration), the design yielded 10 experiments with four factorial points, four axial points to form a central composite design and two central points for replications. The 10 experiments were run in random order to minimize the effects of unexpected variability in observed responses due to extraneous factors. Response surfaces were drawn by using the analysis design procedure of Statistic for Windows software (7.0 version). The actual levels of variables (Table 1) were selected based on the initial levels of inoculum and pulp concentrations as the central points, which were used in the fermentations with three inoculum concentrations. The two variables chosen were designated as x_1 (Inoculum concentration), x_2 (Pulp concentration). A total of ten assays were performed. Viability, pH, lactic acid and total reducing sugar were analyzed over 24 h. Two polynomial models generated as functions of two variables on the predicted responses were represented as follows:

$$\hat{y}_i = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Eq. (1)}$$

Where:

$i = 1 \text{ and } 2$

$\hat{y}_1$ is the viability in relation to pH (RVpH). Higher RVpH indicates that the microorganism is better adapted to stress in the gastrointestinal tract.

$\hat{y}_2$ is the lactic acid concentration.

2.5 Validation of Polynomial Model

A kinetic study was carried under the conditions obtained from the polynomial model for higher RVpH. Initially, *L. rhamnosus* ATCC 7469 was inoculated in MRS broth and incubated at 37°C for 24h. Viability, pH, total reducing sugar and organic acids (citric, malic and lactic acids) were analyzed. These fermentations were also carried out in duplicate.

2.6 Determination of Organic Acids

Citric, malic and lactic acid concentrations were determined by high performance liquid chromatography in a Shimadzu system equipped with a quaternary pump coupled with a degasser (DGU-20A5r), an oven for controlling column temperature, set at 28°C, an auto sampler adjusted for 20 μ L volume and a diode array detector (DAD) (SPD-M20A) with a working wavelength range of 190 – 800 nm. The software used for data acquisition was LC-Solutions, manufactured by Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan). A 300mm x 7.8mm ionic exchange column (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, USA), with 9 μ m particle size, was used. The mobile phase used was ultrapure water acidified with isocratic elution of H₂SO₄ 5 mM at a flow rate of 0.6 mL/min. The correlation coefficients were $R^2 > 0.998$. The accuracy obtained for these

compounds (L-malic, L-lactic, and citric acids) oscillated between 73 % and 98 %.
Repeatability (n = 7) was measured by coefficient of variation (< 1.7%).

2.7 Total Reducing Sugar

The fermented and centrifuged juice was used to analyze total reducing sugar by the dinitrosalicylic method (Miller, 1959), using a spectrophotometer (600Plus, Femto) at 540nm. Initially, the cell-free samples were hydrolyzed with 37% hydrochloric acid at 67°C for 7 minutes and neutralized using NaOH 6M.

2.8 Determination of the Viability

Serial dilutions of fermented passion fruit juice in saline solution 0.9%w/V were performed for viable cell count. Aliquots of 0.1 mL of the diluted fermented juice were plated, in triplicate, in plates containing MRS agar (spread plate method). The plates were incubated inverted at 37 °C for 48 h. Plates containing 30–300 colonies were measured and recorded as colony forming units (CFU) per mL of solution.

2.9 Storage of the Probiotic Passion Fruit Juice

Fermented passion fruit juice obtained under conditions predicted by the model was dispensed into sterile tubes, closed and stored at 4 °C in a refrigerator. Viable counts, pH, total reducing sugar and organic acids were determined prior to cold storage and for times at intervals of 7 days, for 28 days.

2.10 Survival of *L. rhamnosus* under Simulated Gastrointestinal Conditions

The evaluation of probiotic survival under simulated gastrointestinal conditions, with zero and 28 days of refrigerated storage was carried out according to Brinques & Ayub (2011) and Tuo et al. (2013), with modifications. Briefly, 10 mL samples were harvested by centrifugation (10.000 rpm, 10 min, 4°C). The cells were suspended in saline solution containing pepsin (3 g/L) (simulated gastric conditions - SGC) and the pH adjusted to 2.7, 2.5 and 2.0 with HCl (5 M). Simulated intestinal conditions (SIC) were prepared by adding 1 g/L pancreatin in saline solution (0.9% w/V) and adjusting the pH to 7.0 with NaOH (18 M). Resistance was assessed in terms of viable colony counts and enumerated after incubation at 37°C for 0, 60 and 120 min in SGC and 240 min in SIC. Analyses were performed in duplicate on the 28th day after storage.

3. Results and Discussion

3.1 Selection of Inoculum Concentration and Temperature

Passion fruit juice (10 % V/V pulp) was fermented using three different inoculum concentrations (0.1, 1.0 and 5.0 % V/V) and 30 °C (Figure 1a). Higher growth was found for 1.0% V/V inoculum concentration. However, higher consumption of TRS was obtained in the fermentation with a 5 % V/V inoculum concentration. The viability

of *L. rhamnosus* ATCC 7469 remained practically constant and the consumption of TRS was probably only for cellular maintenance, when 5 % V/V was used. The cellular viability expressed as Log (CFU/mL), reached 9 Log when the inoculum concentration was 1.0 % V/V. The results with the 0.1% V/V inoculum concentration were intermediate, between 1.0 and 5.0 % V/V. The pH decreased in all fermentations (< 5.0). Lower pH was found with the 1.0 or 5.0 % V/V. In the next step, 1.0 % V/V as central point was used.

Figures 1 (a-b)

Three different temperatures were tested (30, 33.5 and 37 °C). Higher growth was obtained when the fermentation was carried out at 37 °C. Lower pH values were found in the three cases. Lactic acid was higher at 37 °C (about 6 g/L). *Lactobacillus* growth occurs at temperatures between 2 and 53 °C (Dicks & Endo, 2009). Maximal microbial viability was found by cultivating *L. casei* at 31 °C (Costa et al., 2013).

3.2 Application of a Central Composite Rotatable Design

Assays were carried out as reported on Table 2. Figure 2 shows pH, TRS concentration, lactic acid concentration and viability obtained in all the runs of the Central Composite Rotatable Design (CCRD). Initial pH varied between 5.5 and 6.1, depending on the pulp concentration. Variation coefficient was 1.6%. The genus *Lactobacillus* can grow in a pH range from mild acid to neutral values. Pereira et al. (2011) found higher growth at pH 6.4. In the present work, initial pH 6.0 was

considered ideal for growth. Final pH varied between 4.6 and 5.5. The variation coefficient in this case was 8.9 %, indicating a higher variation, which was dependent on cultivation conditions. Generally, fermented broth with a lower pH value indicates higher production of lactic acid. Like antibiotics, short-chain organic acids also have a specific antimicrobial activity. Unlike antibiotics, the antimicrobial activity of organic acids is pH dependent. There was little antimicrobial activity at pH 7.3, but at pH 4, all organic acids had some activity for *Escherichia coli* (Chaveerach et al., 2002).

Viabilities were higher than 8 Log in all runs and reached 10 Log in runs 4 and 10. This indicates that *L. rhamnosus* ATCC 7469 grows in different inoculum and pulp concentrations. Inoculum concentration varied between 0.09 and 2.91 % V/V, which contained 5 Log and 6 Log, respectively. Pulp concentrations varied between 2.95 (1.48 g/L TRS) and 17.05 % V/V (8.53 g/L TRS). In the run with 0.09 % V/V inoculum concentration, viability increased two units of Log (5 Log to 7 Log) and in the run with 2.91% V/V, the viability increased three units of Log (6 Log to 9 Log). These runs were carried out at the central point of pulp concentration (10 %V/V). In the run with 2.95 % V/V or 17.05 % V/V pulp concentration, the viability increased three units of Log (6 Log to 9 Log). Inoculum concentration in these runs also was at the central point of CCRD (1.5 % V/V).

Table 2

Figure 2

In run 4 (2.5 % V/V inoculum concentration; 15 % pulp concentration), higher viability and lactic acid concentration and lower pH value, were obtained. Similar

results were found in run 10 (1.5 % V/V inoculum concentration; 10 % pulp concentration). Higher growth seems to be related to a decrease in pH and higher production of lactic acid. In run 5, a higher pH, lower viability and lactic acid concentration were found. The inoculum concentration in this run was the lowest value used in the CCRD. To evaluate better conditions for bacterial growth combined with resistance to an acid environment, the RVpH were analyzed, with 24 hours of fermentation (Table 2). Higher RVpH were found in runs 4, 6, 9 and 10. In these runs, lower pH values were found. At a low pH, more of the organic acid will be undissociated, which is lipophilic and can diffuse across cell membranes. A higher pH in its cytoplasm causes dissociation of the acid, and a resultant reduction in the pH of the cell contents, disrupting enzymatic reactions and nutrient transport systems (Dibner and Buttin, 2002).

Lactobacilli are nutritionally fastidious organisms, with their viability and growth influenced by factors such as medium formulation, pH, temperature, and inoculum concentration. Liew et al. (2005) optimized yeast extract, glucose, and vitamin concentrations to maximize the growth of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Under optimal conditions, 9 Log were reached. Chang & Liew (2012) optimized growth medium for biomass production of *L. rhamnosus* ATCC 7469. The optimum-point medium gave high viability (10 Log), specific growth rate and biomass productivity than that studied by de Man, Rogosa and Sharpe. In both studies, yeast extract-based media were used. However, studies on the optimization of the growth of *L. rhamnosus* in fruit juices were not found.

A quadratic model to establish the RVpH was used. Equation (1) was fitted to the experimental data. The statistical significance of the model was evaluated by the F-test, showing that the regression was statistically significant (Table 3). The ratio

between the mean square (MS) of regression and MS residual may be at least ten times higher ($F_{\text{calc}} = 146.75$) than the F-test, tabulated for 95 % confidence ($F_{\text{tab}} = 6.26$). On the other hand, the ratio between the MS of lack of fit and MS of pure error may be at least five times lower ($F_{\text{calc}} = 10$) than the F-test tabulated for 95 % confidence ($F_{\text{tab}} = 215.7$). MS are calculated by ratio between Sum of Squares (SS) and Degrees of Freedom (DF). The coefficient of determination (R^2) of the model was 0.9943, which further indicated that the model was suitable for adequately representing the real relationships among the selected variables. The cross-validated R^2 (Q^2) was 0.9942. This parameter describes the goodness of prediction, showing how well new experiments can be predicted using the mathematical model. The overall second-order polynomial equation for RVpH can be written as follows (Eq. 2):

$$\hat{y}_1 = 2.03 + 0.23x_1 - 0.04x_2 - 0.12x_1^2 - 0.8x_2^2 + 0.12x_1x_2 \quad \text{Eq. (2)}$$

Table 3

Response surface of the RVpH as a function of independent variables (inoculum and pulp concentration) is shown in Figure 3a. Increase inoculum concentration increased the ratio. Therefore, higher growth and lower pH were obtained. Moreover, higher lactic acid production was found. On the other hand, increase pulp concentration decreased the RVpH. The effect of pulp concentration on the ratio is shown in the model as the linear coefficient of x_2 (pulp concentration), since it was negative. However, this effect was not significant according to the t-test (95 % confidence) calculated using Statistica.

Figure 3 (a-b)

By deriving the quadratic model for each one of the variables and equating the resulting equation to zero, it was possible to find the critical point (2.91% V/V inoculum and 14.45 % V/V pulp). To validate the quadratic model, a kinetic study was performed using these cultivation conditions.

A quadratic model was also fitted for lactic acid concentration. The coefficient of determination (R^2) of these model was 0.9749 and the Q^2 was 0.9745. The analysis of variance showed that the model was able to represent the real relationships among the selected variables (Table 3). The overall second-order polynomial equation for lactic acid concentration can be written as follows (Eq. 3):

$$\hat{y}_2 = 4.01 + 1.11x_1 + 1.00x_2 - 0.59x_1^2 - 0.38x_2^2 + 0.49x_1x_2 \quad \text{Eq. (3)}$$

Response surface of the lactic acid concentration as a function of independent variables (inoculum and pulp concentration) is shown in Figure 3b. Increased inoculum and pulp concentration increased the lactic acid concentration. All the effects of variables on the lactic acid concentration were significant according to a t-test (95 % confidence), calculated using Statistica. Further, it was also possible to find the critical point (3.52 % V/V and 23.08 % V/V, for inoculum and pulp, respectively). However, these conditions were not tested, since the model for RVpH showed different effects of the variables on the responses, i.e., for a high ratio, the pulp concentration should decrease. On the other hand, the pulp concentration should increase for a high lactic acid concentration.

3.3 Kinetic study to validate the mathematical model of the ratio between the viability and pH

In the kinetic study to validate the mathematical model of the RVpH, using the cultivation conditions found by Statistica (2.91% V/V inoculum concentration and 14.45 % V/V pulp concentration), a rapid microbial growth was reached (Figure 4a). After 20 h, the viability remained constant in 9 Log. Maximum specific growth rate, $\mu_{\max}$ was 0.25 h^{-1} . Chang and Liew (2012), found 10 Log after 20 h fermentation in a medium based yeast extract, in fermentations with the same microorganism as the present work. In another study, viability increased from 5 Log to 7 Log after 24 h during fermentation of vegetable juices by *L. plantarum* NCDC 414 (Sharma & Mishra, 2014). Maximum RVpH was 2.19, after 20 h of fermentation. This value is very close to that predicted by the mathematical model (2.17).

During fermentation, lactic acid production appears to parallel the growth of the microorganism. Significant lactic acid production occurred during the growth phase as well as during the stationary phase. Uncoupled lactic acid production by *L. rhamnosus* ATCC 7469 was clearly observed when lactic acid production continued after growth had ceased. Thus, it was possible to find a linear relation between the growth and lactic acid production from the beginning of fermentation up to 20 hours ($R^2 = 0.9745$), that is, before the stationary phase. Similar results were found by Sharma & Mishra (2014), in fermentations of juices by *L. plantarum* NCDC 414.

The TRS concentration was almost zero at 16 h. Maximum production of lactic acid was obtained after 27 h (Figure 4b). The pH decreased due to lactic acid production. The lowest pH value found was 4.5. Citric and malic acids remained constant in $5.81 \pm 0.26 \text{ g/L}$ and $0.78 \pm 0.05 \text{ g/L}$, respectively.

Figure 4 (a-b)

The viability of probiotic microorganisms incorporated into food products must be maintained in storage and they must also be able to survive in the host gastrointestinal tract (Sanz, 2007). Figure 5a shows viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469 during refrigerated storage at 4°C. The pH values, viability and lactic acid concentration remained constant in 4.4 ± 0.2 , 10.5 ± 0.5 Log (CFU/mL) and 6.2 ± 0.5 g/L, respectively. According to ANOVA there was no significant difference of these variables during storage. Current Brazilian legislation states that the minimum viable quantity of probiotic culture should be between 8 and 9 log CFU per daily serving portion (ANVISA, 2003, 2008).

Figure 5 (a-b)

In order to survive and colonize in the gastrointestinal tract, probiotic bacteria should be tolerant to low stomach pH (pH 2.5 - 3.5) (Holzapfel et al., 1998). There was no lactobacillus survival at pH 2 and 2.5. On the other hand, the microorganisms remained viable (9 Log) in the simulation of gastro conditions at pH 2.7 and in the simulation of intestinal conditions (Figure 5b).

4 Conclusions

Improved conditions for growth of *L. rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice were found. Passion fruit juice fermented by lactobacilli has an advantage over unfermented juice. Besides containing the probiotic, this juice also contains lactic acid, a natural antibiotic. The fermented juice was viable above 8 Log after 28 days of refrigerated storage; and the lactobacilli were resistant to simulated conditions of the gastrointestinal tract. Therefore, passion fruit from Caatinga juice has the potential for use as a probiotic carrier and can be applied to the cultivation of *L. rhamnosus* ATCC 7469 in any nutrient supplementation.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília DF, Brazil (CNPq). The English text of this paper was revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

References

ANVISA. (2003). Resolução RDC N° 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial da União. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9058#>.

ANVISA. (2008). Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista das

alegações aprovadas.

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.

Araújo, F. P., Santos, C. A. F., Silva, G. C., and Assis, J. S. (2002). Caracterização de frutos de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53.; REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 25, Recife.

Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103, 123 – 128.

Chang, C. P., & Liew, S. L. (2012). Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 536–543.

Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastrointestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539–543.

Chaveerach, P., D. A. Keuzenkamp, H. A. P. Urlings, L. J.A. Lipman, and F. van nape. (2002). In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry Science*, 81, 621–628.

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., de Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimization and product stability. *Food Chemistry*, 139, 261–266.

Dibner, J. J., & Buttin, P. (2002). Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *Journal Applied Poultry Research*, 11, 453–463.

Dicks, L. M. T., & Endo, A. (2009). Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 30, 72–90.

Fonteles, T. V., Costa, M. G., de Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2011). Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2819 – 2826.

Holzapfel, W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huisin'tVeld, J.H.J. (1998) Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101.

Liewa, S. L., Ariffa, A. B., Rahaa, A. R., Ho Y. W. (2005). Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 137– 142.

Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., Pinto, C. L. de O.,
Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the
consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51, 764–770.

Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing
sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011).
Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of*
Microbiology and Biotechnology, 27, 123–128.

Oliveira, G. A., Castilhos, F., Marie-Geneviève, C., Renard, C., & Bureau, S. (2014).
Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual
sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International*, 60,
154-162.

Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from
cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*,
44, 1276–1283.

Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on
fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid

bacteria— with an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 31–42.

Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1-7.

Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1-11.

Saito, H., Watanabe, T. & Tado, O. (1980). Protective effects of lactobacilli on experimental *Escherichia coli* infection. *Medicine and Biology*, 101, 61–64.

Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284–1289.

Sharma V., & Mishra., H. N. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1123-1128.

Tuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., Ai, L., Zhang, Y., Han, X., & Yi, H. (2013). Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe*, 21, 22-27.

489 Velreads, M. M. C., Van Der Belt-Gritter, B., Busscher, H. J., Reid, G., & Van Der
490 Mei, H. C. (2000). Inhibition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber on
491 human urine by lactobacilli – a teleologic approach. *World Journal. Urology*. 18, 422–
492 426.

493

Table1. Levels of fermentation conditions tested in the CCRD.

Variables	Levels				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
Inoculum (% V/V)	0.09	0.5	1.5	2.5	2.91
Pulp (% V/V)	2.95	5	10	15	17.05

Table 2. Experimental design matrix of CCRD and responses (observed and predicted).

Run	Inoculum (% V/V)	Pulp (% V/V)	Viability/pH (Observed)	Viability/pH (Predicted)	Lactic acid (g/L) (Observed)	Lactic acid (g/L) (Predicted)
1	0.5	5	1.77	1.77	1.73	1.42
2	2.5	5	1.95	1.97	2.52	2.64
3	0.5	15	1.46	1.44	2.51	2.43
4	2.5	15	2.13	2.15	5.27	5.64
5	0.09	10	1.45	1.47	0.95	1.25
6	2.91	10	2.14	2.11	4.74	4.39
7	1.5	2.95	1.96	1.94	1.70	1.83
8	1.5	17.05	1.82	1.82	4.84	4.66
9*	1.5	10	2.05	2.03	4.04	4.01
10*	1.5	10	2.17	2.03	3.98	4.01

* Replicate in the central point

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the polynomial quadratic models.

Viability/pH					Lactic acid (g/L)				
Source	SS	DF	MS	p-value	Source	SS	DF	MS	p-value
x_1	0.4189	1	0.4189	0.0112	x_1	9.8541	1	9.8541	0.0092
x_1^2	0.0667	1	0.0667	0.0282	x_1^2	1.6210	1	1.6210	0.0227
x_2	0.0129	1	0.0129	0.0639	x_2	8.0112	1	8.0112	0.0102
x_2^2	0.0264	1	0.0264	0.0446	x_2^2	0.6650	1	0.6650	0.0354
x_1x_2	0.0622	1	0.0622	0.0291	x_1x_2	0.9739	1	0.9739	0.0292
Lack of Fit	0.0031	3	0.0010	0.2536	Lack of Fit	0.5266	3	0.1755	0.0794
Pure Error	0.0001	1	0.0001		Pure Error	0.0021	1	0.0021	

List of Figures

Figure 1. Decreased pH, viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469, growth and TRS concentration in fermentations using three different inoculums (a); decreased pH, viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469, growth and lactic acid concentration in fermentations at three different temperatures (b).

Figure 2. Viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469, TRS concentration, pH and lactic acid concentration in fermentations of passion fruit juice under CCRD conditions.

Figure 3. Response surface for the dependence of Log (CFU/mL)/pH (a) and lactic acid concentration (b) on inoculum and pulp concentrations in fermentation of passion fruit juice by *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Figure 4. Viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469 and TRS concentration (a); organic acid concentrations and pH (b) during fermentation of passion fruit juice.

Figure 5. Survival of *L. rhamnosus* ATCC 7469, pH and lactic acid concentration in fermented passion fruit juice during refrigerated storage (a); survival of *L. rhamnosus* ATCC 7469 after 28 days of storage during exposure to simulated gastric (60 and 120 min) and enteric (240 min) conditions (b).

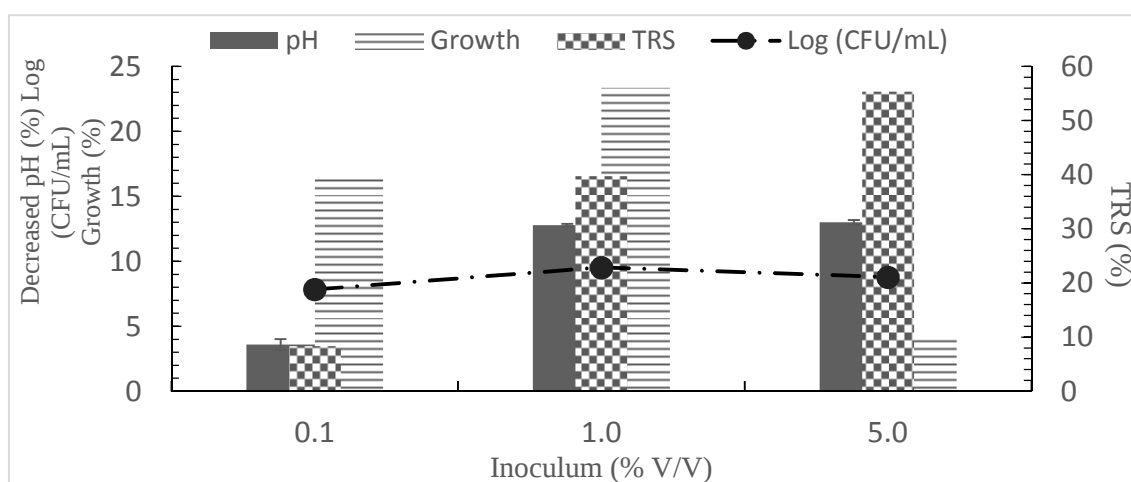


Figure 1a

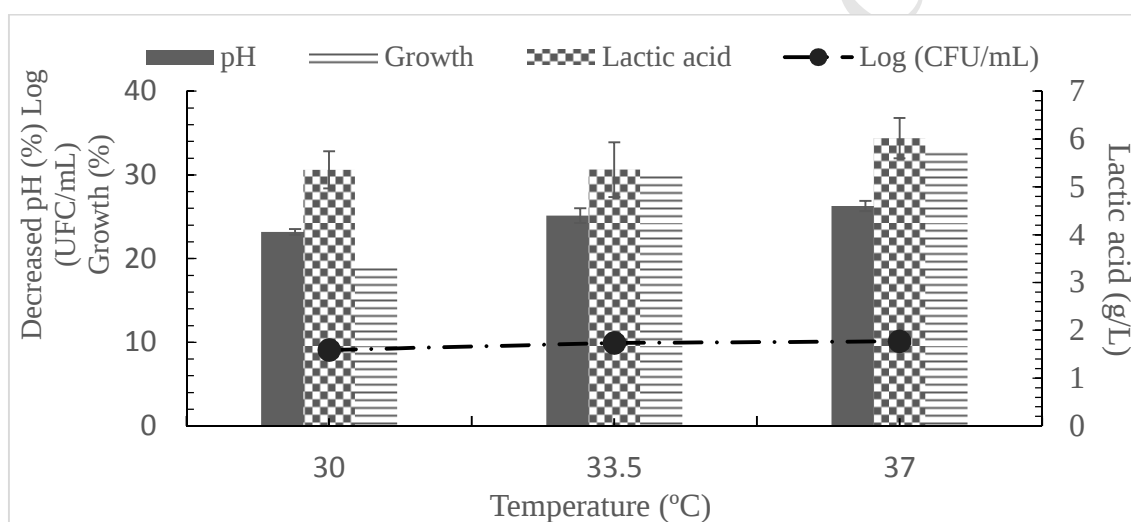
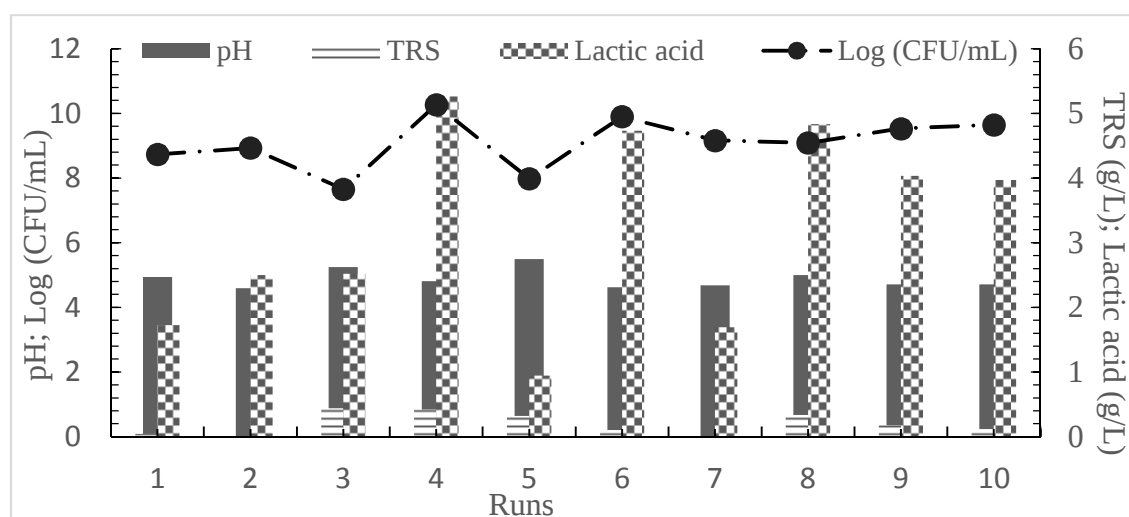


Figure 1b

**Figure 2**

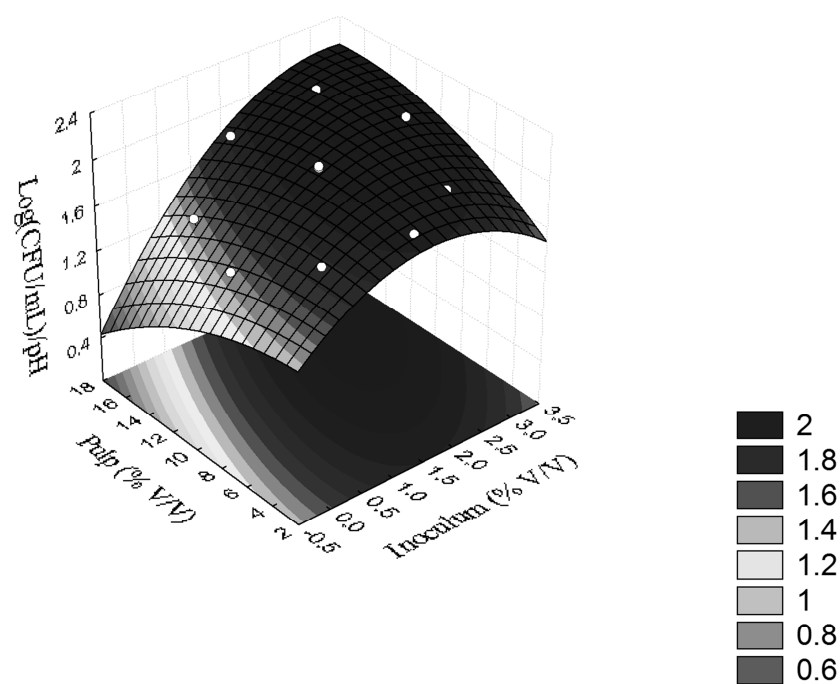


Figure 3a

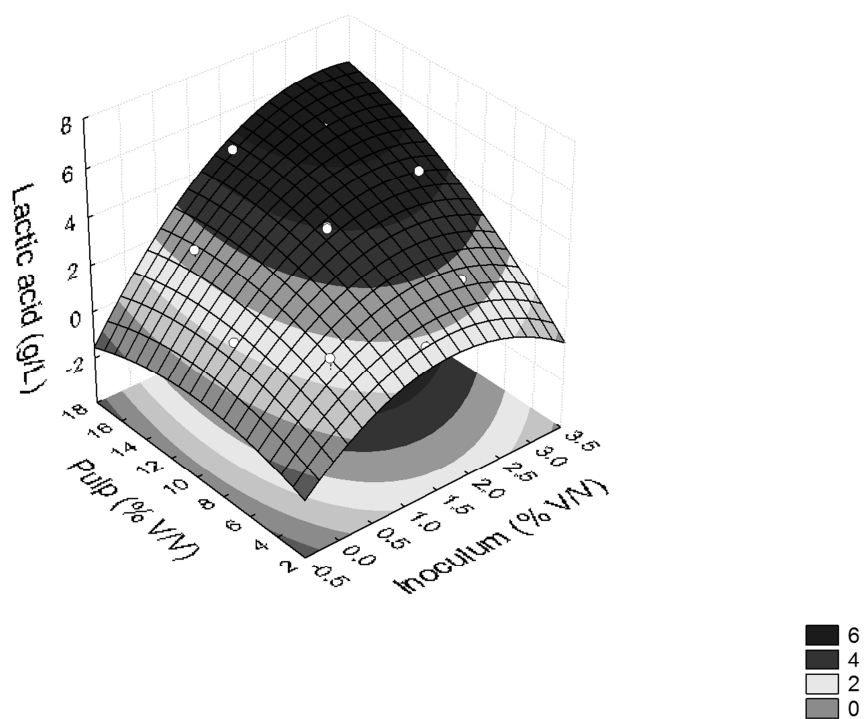


Figure 3b

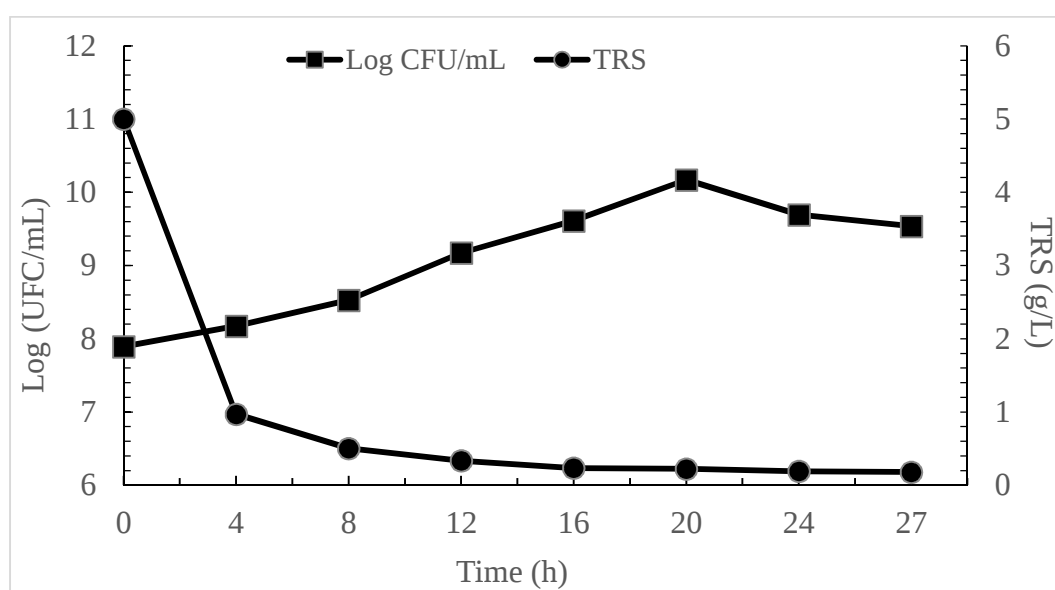


Figure 4a

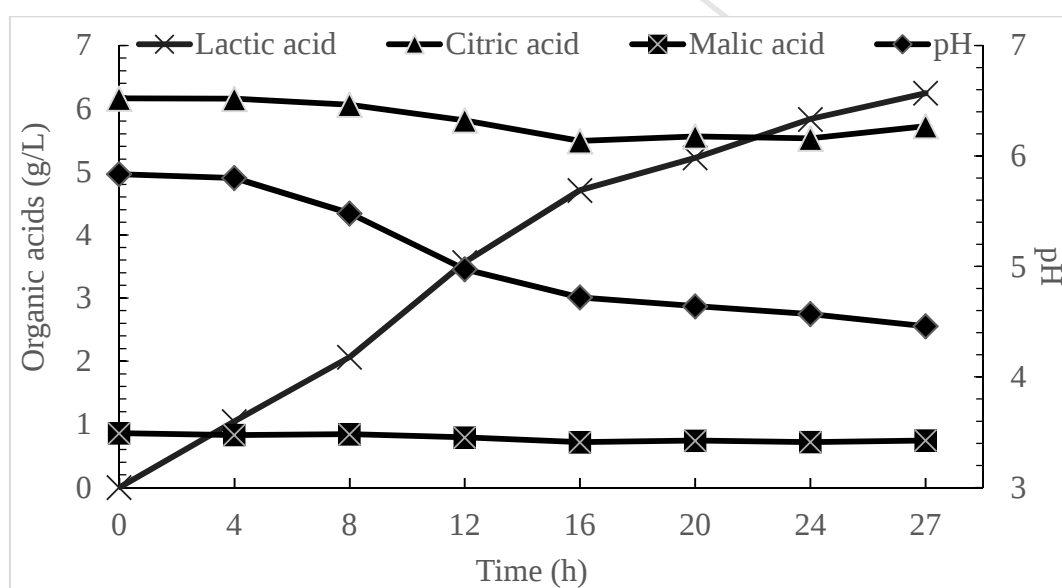
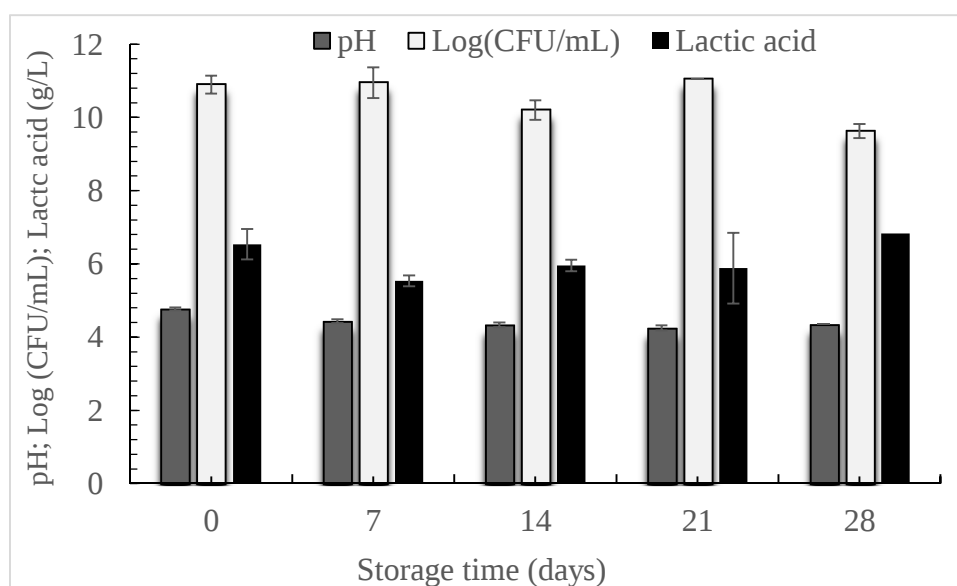
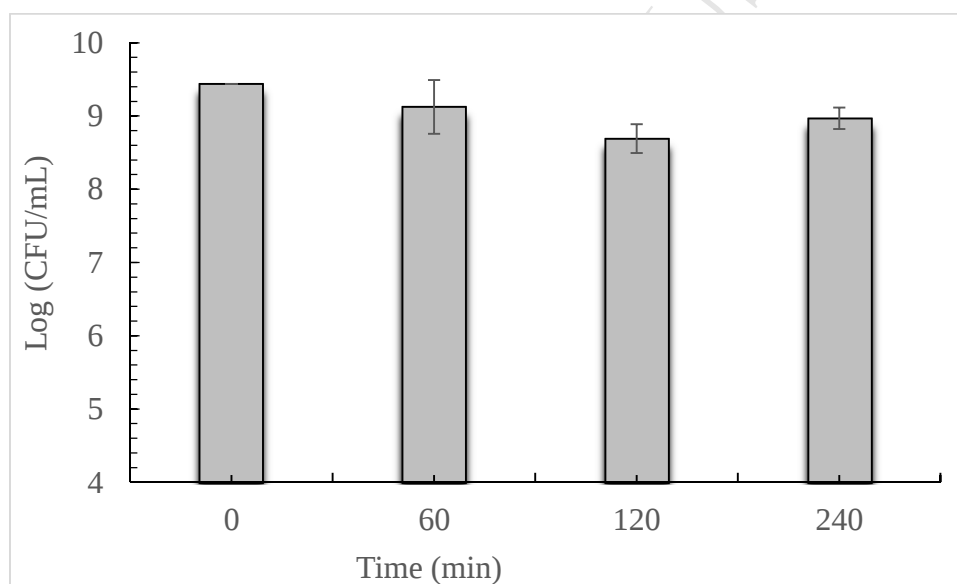


Figure 4b

**Figure 5a****Figure 5b**

Application of a central composite rotatable design enhanced the viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Inoculum and pulp concentrations influenced viability and lactic acid production.

The microorganisms remained with high viability in the simulation of gastro intestinal conditions.