



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

MARIANA DE LUCENA SOARES

**UTILIZAÇÃO DE *PASSIFLORA CINCINNATA*, UM FRUTO DA CAATINGA, NA
PRODUÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA**

Recife

2018

MARIANA DE LUCENA SOARES

**UTILIZAÇÃO DE *PASSIFLORA CINCINNATA*, UM FRUTO DA CAATINGA, NA
PRODUÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Prof^a. Dra. Ester Ribeiro de Andrade
Coorientadora: Prof^a. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Claudina Queiroz (CRB4/1752)

Soares, Mariana de Lucena

Utilização de *Passiflora cincinnata*, um fruto da caatinga, na produção de bebida probiótica / Mariana de Lucena Soares - 2018.

101 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ester Ribeiro de Andrade

Coorientadora: Christine Lamenha Luna Finkler

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Maracujá da Caatinga 2. *Lactobacillus rhamnosus* 3. Liofilização
I. Andrade, Ester Ribeiro de (orient.) II. Finkler, Christine Lamenha Luna (coorient.) III. Título

641.34425

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-081

MARIANA DE LUCENA SOARES

**UTILIZAÇÃO DE *PASSIFLORA CINCINNATA*, UM FRUTO DA CAATINGA, NA
PRODUÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia RENORBIO, Área de Concentração Biotecnologia Industrial, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 07/12/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dra. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Tatiana Souza Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dra. Ester Ribeiro de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

À minha família ancestral, em especial às mulheres, e à minha nova família, Rafael de Queiroz e Martin Lucena de Queiroz, que (in)voluntariamente me impulsionaram a conquistar esta tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à professora Ester Ribeiro de Andrade, por ter me procurado para tentar o doutorado e me confiado à vaga. A senhora é uma excelente orientadora e pessoa. Cresci e aprendi muito nesse período, não só academicamente como pessoalmente. Muito obrigada.

À minha família, em especial às mulheres. Mãe, tias, avós, vocês são exemplos de garra e força. Carrego comigo os ensinamentos dessas mulheres corajosas e amorosas. Agradeço, em especial, à minha mãe por todo amor e incentivo, por sempre estar ao meu lado, me aconselhando e apoiando.

Ao meu pai, por me mostrar a simplicidade da vida e me ensinar que não preciso de muito para viver. Ao meu irmão, que mesmo na dele, não mede esforços para me ajudar.

À minha nova família, que agora é composta pelo meu companheiro e filho. Rafael, obrigada por estar presente em todos os momentos. Você foi essencial para que eu decidisse tentar o doutorado, me incentivou e me apoiou em tudo. Você é um exemplo de pessoa íntegra e profundamente amorosa. Agradeço imensamente ao meu filho, Martin, que mesmo tão pequeno já me ensinou tanto. Você me encoraja e me faz ser mais forte. Você me mostra o verdadeiro amor, puro e inocente, sem julgamentos, só entrega. Rafael e Martin, amo vocês. Obrigada.

Aos meus grandes amigos, desde a época de graduação, Luiz, Mayara e Thay. Vocês tornaram a caminhada mais leve. Mostraram-se presentes e atenciosos. Muito conhecimento foi trocado nos laboratórios da vida e nos bares também.

Aos novos amigos, Bárbara, Suzy, Nati, Elo, Raissa e Ricardo. Os experimentos no laboratório não foram os mesmos sem vocês. Muitas risadas e aprendizados.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LABBIO) pela estrutura física e equipamentos concedidos.

Ao programa de pós-graduação RENORBIO.

À FACEPE pela concessão de bolsas de estudo.

À EMBRAPA e a minha tia Iara pela doação dos frutos do Maracujá da Caatinga.

À Christine Lamenha, pela co-orientação e por disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Bioprocessos, no Centro Acadêmico de Vitória.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi elaborar um produto probiótico à base do suco de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) e analisar a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante o armazenamento. Foi realizado o estudo da composição físico-química da polpa de Maracujá e a investigação da melhor condição de crescimento do probiótico, variando as concentrações de polpa e de inóculo. Três sucos contendo células livres foram elaborados, os quais diferiram quanto a ser fermentado e não fermentado, e armazenados durante 28 dias a 4°C. A viabilidade, o pH, os açúcares redutores totais e o ácido lático foram avaliados durante o armazenamento. Posteriormente, *L. rhamnosus* foi encapsulado por extrusão e as cápsulas submetidas à liofilização. Quatro tipos de cápsulas liofilizadas foram elaboradas, as quais variaram quanto à presença do crioprotetor e do suco do Maracujá na composição. Os liofilizados foram armazenados em temperatura ambiente (25°C) e a viabilidade analisada até 60 dias. Além disso, os liofilizados, cápsulas sem liofilização e células livres foram adicionados ao suco de Maracujá e mantidos a 4°C por 120 dias. A viabilidade, o pH e o ácido lático foram avaliados durante o armazenamento. As cápsulas com e sem liofilização foram caracterizadas quanto à umidade, tamanho e morfologia. Nos resultados da caracterização, a polpa continha 50 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais, 46 g.L⁻¹ de ácido cítrico e 9 g.L⁻¹ de ácido málico, pH 3,0 e 13,5 de °Brix. O suco de Maracujá se mostrou adequado à incorporação de *L. rhamnosus*, pois a viabilidade permaneceu acima de 10⁹ UFC/mL durante os 28 dias de armazenamento à 4°C. A técnica de extrusão foi eficaz para encapsular 90,56 % do probiótico. A secagem por liofilização se mostrou adequada, visto que as eficiências variaram entre 70,36 e 87,29 % nas cápsulas liofilizadas. O armazenamento das cápsulas liofilizadas em temperatura ambiente foi mais adequado do que quando refrigeradas, apresentando sobrevivências acima de 80 % com 30 dias. Quando sob-refrigeração, as maiores sobrevivências foram encontradas nos sucos contendo células encapsuladas sem liofilização e livres (92,9 % e 76,7 %, respectivamente), em 120 dias. Dessa maneira, conclui-se que o suco de Maracujá da Caatinga contendo células encapsuladas sem liofilização poderia ser recomendados para 120 dias de armazenamento refrigerado. Bem como, produtos secos poderiam representar outra opção de veículo probiótico para consumo em 30 dias.

Palavras-chave: Extrusão. Liofilização. Maracujá da Caatinga. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC

ABSTRACT

The goal objective of this work was to elaborate a probiotic product based on passion fruit from Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) and to analyze the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 during storage. The physicochemical composition of the passion fruit pulp and the investigation of the best growth condition of the probiotic were carried out, varying the concentrations of pulp and inoculum. Three juices containing free cells were elaborated, which differed to be fermented and unfermented, and stored for 28 days at 4 ° C. Viability, pH, total reducing sugars and lactic acid were evaluated during storage. After these steps, *L. rhamnosus* was encapsulated by extrusion and the wet capsules were submitted to lyophilization. Four lyophilized capsules types were elaborated, which varied as to the presence of the cryoprotectant and the passion fruit juice of the Caatinga in the composition. The lyophilizates were stored at room temperature and the viability analyzed at until 60 days. In addition, the lyophilizates, non-lyophilized capsules and free cells were added to passion fruit juice and kept at 4 ° C for 120 days. Viability, pH and lactic acid were evaluated during refrigerated storage. The capsules with and without lyophilization were characterized for moisture, size and morphology. In the characterization results, the pulp contained 50 g.L⁻¹ of total reducing sugars, 46 g.L⁻¹ citric acid and 9 g.L⁻¹ malic acid, pH 3.0 and 13.5 Brix. Passion fruit juice was adequate for the incorporation of *L. rhamnosus*, as viability remained above 10⁹ CFU/mL during the 28 days of storage at 4 ° C. The extrusion technique was effective to trap 90.56 % of the probiotic. Drying by lyophilization was adequate, since efficiencies varied between 70.36 and 87.29 % in lyophilized capsules. Storage of lyophilized capsules at room temperature was more adequate than when refrigerated, with survivals above 80% at 30 days. When under-refrigerated, the highest survivals were found in juices containing non-lyophilized capsules and free cells (92.9% and 76.7%, respectively) at 120 days. Thus, it is concluded that Caatinga passion fruit juice containing non-lyophilized capsules could be recommended for 120 days of refrigerated storage. As well, dry products could represent another choice of probiotic vehicle for consumption in 30 days.

Keywords: Extrusion. Lyophilization. Passion fruit from Caatinga. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Rota metabólica da glicose em bactérias ácido lácticas. | 21 |
| Figura 2 - Maracujá da Caatinga (<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.)..... | 32 |
| Figura 3 - Ilustração da estrutura da pectina com variados açúcares. | 36 |
| Figura 4 - Estrutura geral da cadeia de ácido-D-galacturônico. | 37 |
| Figura 5 - Esquema de encapsulação pelo método de extrusão. | 39 |
| Figura 6 - Esquema da metodologia aplicada na elaboração dos sucos probióticos contendo células livres. | 45 |
| Figura 7 - Esquema dos processos de elaboração das cápsulas com e sem liofilização..... | 48 |
| Figura 8 - Esquema do armazenamento das cápsulas com e sem liofilização em temperatura ambiente e refrigerada. | 50 |
| Figura 9 - Viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469, concentração de ART, pH e concentração de ácido láctico após as fermentações nas condições do planejamento experimental | 56 |
| Figura 10 - Razão entre a viabilidade e o pH em função das concentrações da polpa do Maracujá da Caatinga e de inóculo utilizadas nas fermentações..... | 58 |
| Figura 11- 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>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469. | 59 |
| Figura 12 - Viabilidade do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 e concentração de ART durante a fermentação do Maracujá da Caatinga..... | 60 |
| Figura 13 - Concentração de ácidos orgânicos e pH durante o cultivo do Maracujá da Caatinga..... | 61 |
| Figura 14 - Viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 nos sucos do Maracujá da Caatinga (B1, B2 e B3), durante armazenamento refrigerado. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($P \leq 0.05$) durante o tempo na mesma condição de armazenamento; diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($P \leq 0.05$) entre as condições de armazenamento durante o tempo. | 63 |
| Figura 15 - Superfície de resposta obtida para a eficiência da encapsulação em função das concentrações de pectina e de CaCl_2 utilizadas na encapsulação de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469..... | 68 |

| | |
|--|----|
| Figura 16 – Viabilidade e sobrevivência após 30 dias de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 nas cápsulas liofilizadas e armazenadas em temperatura ambiente. L1 –cápsulas liofilizadas sem suco e sem crioprotetor; L2 – cápsulas ressuspendidas no suco do Maracujá da Caatinga (20 % m/V de polpa e 10 % m/V de sacarose) antes da liofilização; L3 – cápsulas ressuspendidas em solução de sacarose (10 % m/V) antes da liofilização; L4 – cápsulas liofilizadas contendo sacarose dentro da matriz polimérica. | 71 |
| Figura 17 - Viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 livre e encapsulado, mantidos no suco do Maracujá da Caatinga, durante armazenamento refrigerado. NL – cápsulas não liofilizadas; CL – células livres; L1*, L3* e L4* - cápsulas L1, L3 e L4 adicionadas ao suco, respectivamente. | 73 |
| Figura 18 - Sobrevivência de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 livre e encapsulado, mantidos no suco do Maracujá da Caatinga, durante armazenamento refrigerado. NL - cápsulas não liofilizadas; CL - células livres; L1*, L3* e L4* - cápsulas L1, L2 e L3 adicionadas ao suco, respectivamente. | 74 |
| Figura 19 - Imagem fotográfica da cápsula de pectina: (a) Observação direta; (b) corte transversal (aumento 1000x) e (c) liofilizadas. | 76 |
| Figura 20 - Imagens de MEV das cápsulas liofilizadas. (a) Cápsula inteira. Aumento de 40x. (b) Secção da parede das cápsulas. Aumento 100x. | 77 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Viabilidades de <i>Lactobacillus</i> spp. em sucos de frutas durante armazenamento refrigerado. | 30 |
| Tabela 2 - Fatores e níveis do planejamento composto central rotacional. | 44 |
| Tabela 3 - Fatores e níveis do segundo planejamento composto central rotacional. | 47 |
| Tabela 4 - Caracterização físico-química da polpa do Maracujá da Caatinga. | 53 |
| Tabela 5 - Condições do planejamento experimental e as respostas da razão entre viabilidade e pH e ácido lático. | 55 |
| Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático polinomial. | 57 |
| Tabela 7 - Concentração de ART, ácido lático e pH dos sucos fermentado (B3) e não fermentados (B1 e B2). | 64 |
| Tabela 8 - Viabilidade do probiótico e eficiência da encapsulação após técnica de extrusão. | 65 |
| Tabela 9 - Condições do planejamento experimental e as respostas da eficiência da encapsulação. | 66 |
| Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o segundo modelo quadrático polinomial. | 67 |
| Tabela 11 - Eficiência da liofilização das cápsulas obtidas pelo método de extrusão. | 69 |
| Tabela 12 - Produtividade e diminuição do pH durante o armazenamento refrigerado dos sucos contendo células livres, encapsuladas com e sem liofilização. | 75 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| ANOVA | Análise de Variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ART | Açúcares Redutores Totais |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BAL | Bactérias Ácido Láticas |
| CaCl ₂ | Cloreto de Cálcio |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DAD | Detector por Arranjo de Diodo |
| DCCR | Delineamento Composto Central Rotacional |
| DNSA | Ácido Dinitrosalicílico |
| DP | Desvio Padrão |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EFFCA | European Food and Feed Cultures Association |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GRAS | Generally Recognized As Safe |
| GL | Grau de Liberdade |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| IAL | Instituto Adolfo Lutz |
| ILSI | International Life Science Institute |
| JECFA | <i>Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> |
| LABBIO | Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos |
| MQ | Média Quadrática |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MRS | de Man, Rogosa & Sharpe |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| PIQ | Padrão de Identidade e Qualidade |
| RVpH | Razão entre Viabilidade e pH |
| SQ | Soma Quadrática |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Objetivo geral | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos | 18 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 Características gerais das bactérias ácido láticas | 19 |
| 3.2 Probióticos | 22 |
| 3.2.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 26 |
| 3.3 Alimentos funcionais | 27 |
| 3.3.1 Sucos de fruta como veículos para probióticos | 29 |
| 3.3.1.1 Maracujá da Caatinga (<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.) | 31 |
| 3.4 Encapsulação | 34 |
| 3.4.1 Pectina..... | 35 |
| 3.4.2 Métodos de encapsulação | 38 |
| 4 METODOLOGIA..... | 43 |
| 4.1 Coleta e processamento dos frutos | 43 |
| 4.2 Micro-organismo | 43 |
| 4.3 Inóculo e fermentação | 43 |
| 4.4 Planejamento experimental..... | 44 |
| 4.5 Incorporação do probiótico na bebida do Maracujá da Caatinga e avaliação do armazenamento refrigerado | 44 |
| 4.6 Produção das cápsulas | 46 |
| 4.6.1 Preparo das células para encapsulação | 46 |
| 4.6.2 Preparo das cápsulas pelo método de extrusão..... | 46 |
| 4.6.3 Influência do método de liofilização na viabilidade do probiótico..... | 47 |
| 4.7 Eficiência da encapsulação | 48 |
| 4.8 Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 | 49 |
| 4.9 Caracterização das cápsulas..... | 49 |
| 4.10 Aplicação das cápsulas com e sem liofilização no suco do Maracujá da Caatinga..... | 50 |
| 4.11 Análises físico-químicas..... | 51 |
| 4.11.1 Caracterização físico-química da polpa do Maracujá da Caatinga..... | 51 |
| 4.11.2 Quantificação dos ácidos cítrico, málico e lático | 51 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| 4.11.3 | Quantificação dos açúcares redutores totais..... | 51 |
| 4.11.4 | Determinação do pH..... | 52 |
| 4.12 | Análises estatísticas | 52 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 53 |
| 5.1 | Caracterização da polpa do Maracujá da Caatinga..... | 53 |
| 5.2 | Avaliação das quantidades mais adequadas de polpa e inóculo para fermentação do Maracujá da Caatinga | 54 |
| 5.3 | Estudo cinético da fermentação usando as melhores condições previstas pelo DCCR | 59 |
| 5.4 | Avaliação dos sucos probióticos durante armazenamento refrigerado | 62 |
| 5.4.1 | Viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> no suco do Maracujá da Caatinga | 62 |
| 5.4.2 | Concentração de carboidratos, ácido lático e pH dos sucos probióticos durante o armazenamento refrigerado | 63 |
| 5.5 | Experimentos preliminares para a encapsulação de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 | 64 |
| 5.6 | Aplicação do Planejamento Composto Central Rotacional para otimização da encapsulação..... | 65 |
| 5.7 | Eficiência da liofilização | 68 |
| 5.8 | Influência das condições das células na manutenção de sucos probióticos durante armazenamento refrigerado | 72 |
| 5.9 | Caracterização das cápsulas..... | 76 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 79 |
| | REFERÊNCIAS..... | 80 |
| | ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO..... | 101 |

1 INTRODUÇÃO

O papel principal da dieta é fornecer nutrientes para atender as necessidades metabólicas, dando ao consumidor uma sensação de satisfação e bem-estar. No entanto, os conhecimentos recentes suportam a hipótese de que, além de atender as necessidades nutricionais, a dieta pode modular diversas funções fisiológicas e podem desempenhar papéis prejudiciais ou benéficos em algumas doenças (GRANATO et al., 2010).

A mudança na forma de conceber os alimentos levou à introdução do conceito de alimentos funcionais (FIGUEROA-GONZÁLES et al., 2011). Exemplos bem conhecidos de alimentos funcionais são aqueles que contêm ou são preparados com compostos bioativos, tais como fibra dietética, oligossacarídeos e bactérias ativas que favorecem o equilíbrio de estirpes bacterianas intestinais, chamadas probióticos (PERRICONE et al., 2015). Probióticos pertencem a uma geração de ingredientes ativos, no qual a maior parte das pesquisas tem incidido (FIGUEROA-GONZÁLES et al., 2011).

Probióticos são um grupo de bactérias e leveduras que exercem efeito positivo sobre a saúde do hospedeiro. Os alimentos mais amplamente utilizados como veículos de probióticos são os produtos lácteos (CASAROTTI; PENNA, 2015). Porém, os sucos de frutas vêm apresentando destaque na indústria alimentícia, por serem indicados como meio ideal para ingredientes funcionais, uma vez que são inerentemente ricos em nutrientes, têm perfis de sabor agradável para o público em geral, e são amplamente percebidos como saudáveis e refrescantes (CORONA et al., 2016). Diante da variedade de frutas utilizadas na elaboração de bebidas comerciais, o Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) vem recebendo destaque por pesquisadores nacionais (FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; SANTOS; ANDRADE; GOUVEIA, 2017). O Maracujá da Caatinga é uma fruta de aroma e sabor diferenciados, com alto teor de vitamina C e propriedade calmante (ARAÚJO et al., 2016).

Muitos fatores podem afetar a viabilidade dos probióticos nos alimentos prontos para consumo incluindo a linhagem escolhida, o pH do meio de cultura, a temperatura, o tempo de armazenamento e o tipo de alimento utilizado (BAKR, 2015). Como forma de prolongar a vida útil dos probióticos, alguns métodos têm sido propostos como: adaptação e indução de resistência na matriz alimentar (BEVILACQUA et al., 2013), análise de condições de armazenamento (PERRICONE et al., 2014) e encapsulação (CORBO et al., 2013).

A encapsulação é uma tecnologia que tem sido aplicada na indústria alimentícia para fins de isolamento, proteção e/ou liberação controlada de células bacterianas, favorecendo a

sobrevivência por longos períodos de tempo, através da manutenção da atividade metabólica e de crescimento (RATHORE et al, 2013). Existem alguns desafios quando se considera a encapsulação de probióticos como o tipo de material e a técnica utilizada para o encapsulamento.

Dentre as técnicas utilizadas para encapsulação de probióticos, destacam-se extrusão e liofilização. O uso conjunto destas duas técnicas vem sendo aplicado, majoritariamente, com intuito de prolongar a viabilidade dos micro-organismos, sem a inclusão em um veículo alimentício (ALBADRAN et al., 2015; ECTHEPARE et al., 2016; LI et al., 2016; XU et al., 2016; HALIM et al., 2017). Poucos trabalhos, que realizaram estas duas técnicas em conjunto, incorporaram as cápsulas em produtos alimentícios (SHOJI et al., 2013; RIBEIRO et al, 2014; MOUMITA et al., 2017; 2018).

A pectina é um biopolímero que tem sido amplamente utilizado como agente geleificante e estabilizante na indústria de alimentos, sendo reconhecida como aditivo alimentício seguro (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*). Sua aplicação como material encapsulante é vantajosa uma vez que consiste em um polímero não tóxico, de baixo custo e de fácil obtenção (COOK et al., 2012).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo elaborar um suco probiótico do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, tanto na forma livre quanto encapsulado com pectina, sendo a encapsulação realizada pela técnica de extrusão seguida da secagem por liofilização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar um suco probiótico do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, tanto na forma livre quanto encapsulado com pectina.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a polpa do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) quanto aos teores de carboidratos, ácidos orgânicos, pH, proteínas e Brix;
- Investigar a melhor condição de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 na bebida probiótica, variando as concentrações de polpa e de inóculo;
- Caracterizar os sucos contendo células livres quanto à viabilidade celular, pH, ácidos orgânicos e açúcares redutores totais durante o armazenamento refrigerado;
- Produzir e caracterizar cápsulas de pectina contendo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469;
- Avaliar a técnica de liofilização sobre a viabilidade do micro-organismo probiótico após a encapsulação;
- Determinar a viabilidade celular nas cápsulas liofilizadas durante o armazenamento em temperatura ambiente;
- Determinar a viabilidade e o perfil de acidificação dos sucos probióticos contendo cápsulas com e sem liofilização durante o armazenamento refrigerado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais das bactérias ácido lácticas

A primeira descoberta de bactérias ácido lácticas foi realizada por Louis Pasteur em 1857 durante uma fermentação alcoólica. Mais tarde, em 1899, o pesquisador Henry Tissier isolou *Bacillus bifidus* (*Bifidobacterium*), uma bactéria anaeróbica, das fezes de crianças amamentadas, que culminou em pesquisas sobre nutrição infantil e microbiota intestinal na área de pediatria. Em 1904, o cientista russo e professor do Instituto Pasteur, Elie Metchnikoff, descobriu a presença de *Bacillus bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*) no iogurte, o que levou ao início dos estudos sobre bactérias ácido lácticas. Orla-Jensen, em 1919, isolou *Lactobacillus casei* no queijo (ORLA-JENSEN, 1919), sendo a mesma espécie isolada dez anos depois por Shirota, no trato gastrointestinal humano (BYOND; MIN-TZE; SY-BING, 2014). A partir disso, o grupo de bactérias lácticas, ou seja, bactérias do ácido láctico (BAL) passou a ser reconhecido como um dos mais importantes para o homem, tanto pelo papel que exerce na produção e preservação dos alimentos quanto pelo envolvimento em diferentes aspectos da saúde humana e animal (FERREIRA, 2012).

As bactérias lácticas constituem um grupo de bactérias Gram-positivas unidas por características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Essas bactérias são não-esporeadas, apresentam catalase negativa (algumas espécies podem produzir pseudocatalase, outras podem apresentar reação positiva em meios contendo hematina ou sangue como um dos componentes), podem ser anaeróbicas, anaeróbicas facultativas ou microaerófilas, produzindo ácido láctico como produto do metabolismo primário. São micro-organismos fastidiosos e estão presentes em ambientes como vegetais, produtos cárneos, lácteos e cavidades humana (oral, respiratória, gastrointestinal e vaginal) e animal (LAHTINEN et al., 2011; FERREIRA, 2012; BYOND; MIN-TZE; SY-BING, 2014; CAI, 2014).

A grande variedade de habitats justifica a diversidade genética desse grupo (BRON; KLEEREBEZEM, 2011). Atualmente, a classificação das bactérias lácticas inclui seis famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*. Dentre estas, as famílias *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae* possuem a maioria dos gêneros e espécies que são essenciais para fermentação de alimentos, sendo usados como culturas fermentadoras. As outras duas famílias (*Aerococcaceae* e *Carnobacteriaceae*) estão mais relacionadas com contaminantes alimentares (KHANDELWAL et al., 2016).

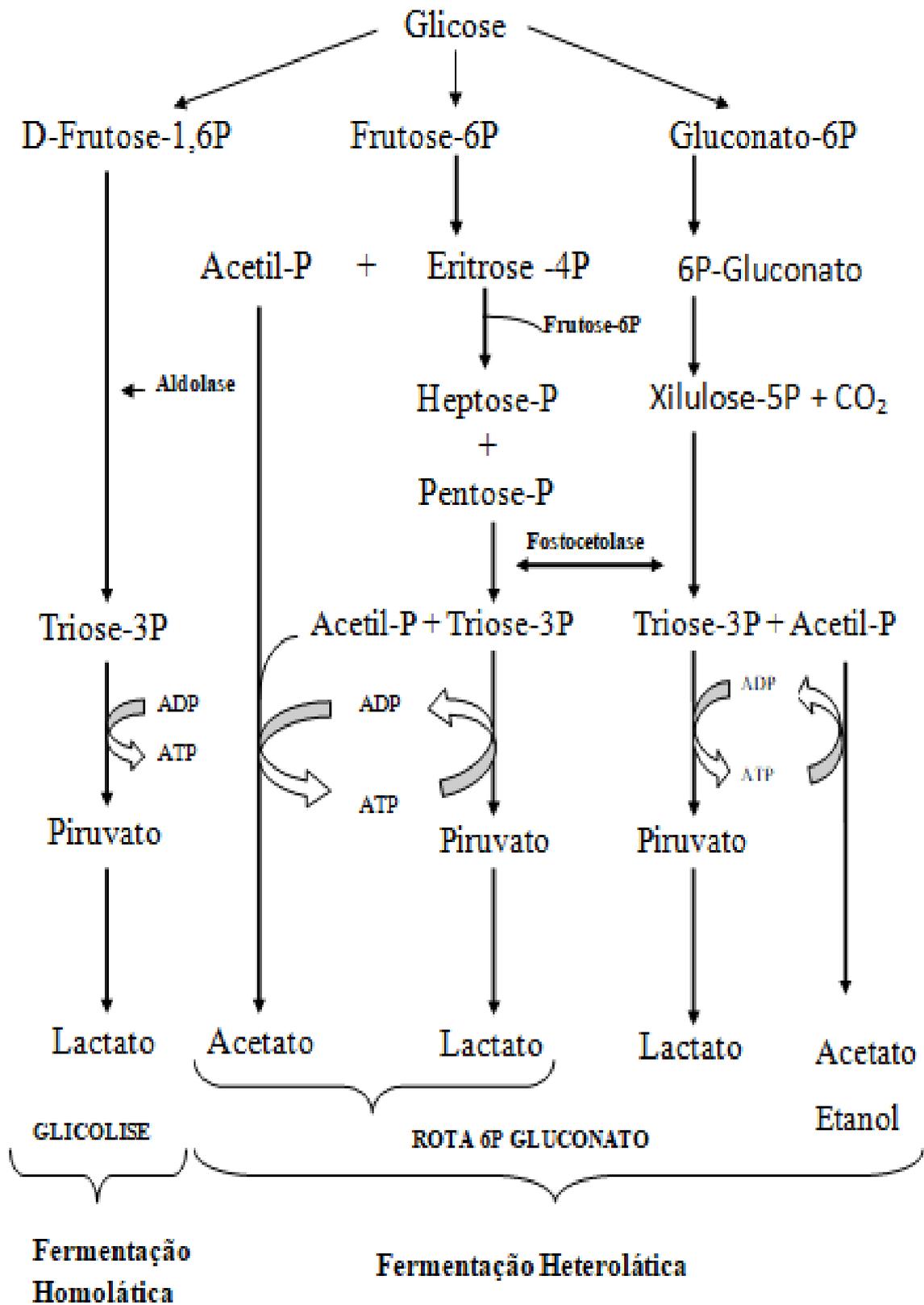
Lactobacillaceae é a mais numerosa e heterogênea família das bactérias lácticas, compreendendo cerca de 180 espécies, embora novas espécies sejam descritas periodicamente. Esta família consiste em bactérias não formadoras de esporos, podem se apresentar na forma de cocos ou bacilos, podem ser móveis, geralmente aerotolerantes, acidófilas, obrigatoriamente sacarolíticas, com diferença no produto final da fermentação (KOWALEZYK et al., 2016).

Dentro desta família, destaca-se o gênero *Lactobacillus* que, em humanos, pode ser encontrado no trato gastrointestinal, desde a cavidade oral (ALANDER et al., 1999) até o material fecal (EL AILA et al., 2009). *Lactobacillus* também são importantes membros da microbiota vaginal (CAI, 2014). O conhecimento do metabolismo de bactérias lácticas deve-se principalmente a este gênero, sendo o tipo de fermentação um importante critério taxonômico.

Geralmente, são espécies que desempenham fermentação homoláctica (chamado metabolismo homofermentativo), produzindo mais de 85% de ácido láctico a partir de hexoses, usando a via glicolítica (Embden-Meyerhoff-Parnas); bem como espécies heterofermentativas facultativas que podem utilizar a via fosfogluconato sob certas condições de crescimento e gerar acetato, etanol, CO₂ e lactato; e, finalmente, espécies cujo metabolismo é denominado heterofermentativo obrigatório, que inclui a via das pentoses resultando na geração de lactato, etanol, acetato e CO₂ (VALENZUELA et al., 2015; KOWALEZYK et al., 2016).

Como exemplo de micro-organismos pertencentes a cada tipo de metabolismo, destacam-se três grupos do gênero *Lactobacillus*: o grupo I que é homofermentativo: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* e *L. salivarius*, o grupo II que é facultativo: *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. curvatus* e *L. sakei* e o grupo III: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* e *L. reuteri* que é obrigatoriamente heterofermentativo (BYOND; MIN-TZE; SY-BING, 2014). Na Figura 1 podem-se verificar as principais vias metabólicas das bactérias ácido lácticas.

Figura 1 - Rota metabólica da glicose em bactérias ácido lácticas.



Fonte: Adaptado de Wood e Holzapfel (1995).

Muitas espécies de *Lactobacillus* são conhecidas por produzirem uma grande quantidade de compostos químicos que possuem atividade antimicrobiana, tais como ácidos orgânicos, compostos de baixo peso molecular e proteínicos. Ácidos orgânicos como acético, láctico, propiônico, sórbico e benzóico são usados como conservantes químicos de alimentos para reduzir o crescimento de contaminantes (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016). Por outro lado, compostos proteínicos, chamados de bacteriocinas, como a nisina, tem mostrado efeito inibitório no crescimento e desenvolvimento de micro-organismos contaminantes de alimentos como, por exemplo, *Clostridium* spp. Similarmente, a reuterina produzida a partir do glicerol por algumas linhagens de *Lactobacillus reuteri* é outro composto que possui um largo espectro de inibição contra patógenos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Atualmente, bactérias do gênero *Lactobacillus* são encontradas em muitos, se não na maioria, dos alimentos fermentados, particularmente em produtos lácteos, tais como iogurtes, queijos e leites (KHANDELWAL et al., 2016). Anteriormente, estes micro-organismos eram adicionados como parte do processo de fermentação, no entanto, cada vez mais estão sendo adicionados como suplementos alimentares (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

3.2 Probióticos

O conceito de probiótico foi desenvolvido no início do século XX pelo cientista russo Elie Metchnikoff, ganhador do prêmio Nobel em 1908, que sugeriu que a vida saudável e longa de camponeses búlgaros resultava do consumo regular de produtos lácteos fermentados. Mais tarde, Metchnikoff encontrou micro-organismos vivos (*Lactobacillus*) no iogurte, no qual ele relacionou os efeitos benéficos a estes micro-organismos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

A definição amplamente utilizada sobre probióticos é a da FAO/WHO (Food and Agriculture Organization) (2001): “São micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, podem causar benefícios à saúde do hospedeiro”. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em sua resolução nº02/2002, definiu probióticos da seguinte maneira: “micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo”. Seguindo esta definição, o International Life Science Institute (ILSI, 2002) e European Food and Feed Cultures Association (EFFCA, 2003) também deram denominações similares: “Um ingrediente alimentar microbiano que, quando consumido em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do consumidor” e “Micro-organismos vivos que, quando ingeridos ou aplicados

localmente em número suficiente, promovem um ou mais benefícios comprovados ao consumidor”, respectivamente.

Nota-se, a princípio, que para serem declarados como probióticos, estes devem possuir alegações de benefício à saúde do consumidor. Contudo, outros critérios devem ser adotados, como os estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2002) para incluir os probióticos como constituintes funcionais:

- caracterização do micro-organismo quanto ao gênero, espécie e linhagem;
- produção de toxinas e bacteriocinas;
- perfil de resistência a antimicrobianos e informações sobre a base genética da resistência antimicrobiana, conforme metodologia descrita pela European Food Safety Authority (EFSA);
- estudos disponíveis na literatura que descrevam efeitos adversos observados com a linhagem em questão (ex. relatos de casos);
- demonstração de eficácia;
- viabilidade.

A comprovação da eficácia para efeitos funcionais deve estar baseada em evidências científicas robustas, na qual a identificação e mensuração do efeito devem estar claramente definidas como, por exemplo, no trabalho de revisão de Patel & Underwood, (2018), em que foram realizados ensaios randômicos e observacional, e relacionaram um forte efeito do tratamento com probióticos na redução da enterocolite necrosante. Da mesma forma, as alegações de saúde devem estar baseadas em estudos epidemiológicos (BRASIL, 2002).

Sobre a viabilidade, a ANVISA (BRASIL, 2002) define que a quantidade mínima de micro-organismos probióticos viáveis deve estar situada entre 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação de uso diário do produto pronto para o consumo. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove a eficácia funcional através de estudos laboratoriais e clínicos. Já a FAO/WHO (2001) afirma que o produto deve conter mais que 10^6 UFC/g após 42 dias de armazenamento.

Outros fatores importantes para o micro-organismo ser classificado como probiótico, são: (1) ser de origem humana; (2) não ser patogênico, (3) resistir aos processos tecnológicos permanecendo viáveis e com os aspectos funcionais presentes, (4) apresentar estabilidade ao meio ácido do estômago e bile, (5) aderir ao tecido epitelial, (6) possuir habilidade para

persistir dentro do trato gastrointestinal através do antagonismo aos patógenos e da capacidade de colonização, (7) produzir substâncias antimicrobianas, (8) apresentar habilidade de modular o sistema imune através da estimulação ou supressão da resposta imunológica e (9) influenciar atividades metabólicas (FERREIRA, 2012).

A maioria dos probióticos pertence aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enquanto *Saccharomyces cerevisiae boulardii* é a única levedura com características probióticas comprovada, que é comercializada. A principal razão para estes gêneros é o conhecimento do uso seguro (*security safe*) (TRIPATHI; GIRI, 2014). Dentre estes gêneros destacam-se: *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, assim como, *B. brevis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis* como as principais relatadas na literatura (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011).

Muito dos efeitos benéficos causados pelos probióticos estão relacionados com a saúde do intestino (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). *Lactobacillus kefir* LKF01 mostrou uma forte capacidade de modular a microbiota intestinal, levando a uma redução significativa de vários gêneros bacterianos diretamente envolvidos na resposta inflamatória e doenças gastrointestinais (TOSCANO et al., 2016). *Lactobacillus reuteri* DSM17938 foi bem tolerado por crianças com diarreia aguda, diminuindo os sintomas da infecção após o período de ingestão do probiótico (DINLEYICI et al., 2015).

Por conseguinte, os probióticos promovem outras propriedades funcionais que vão além do trato gastrointestinal, tais como: (1) melhoram a absorção de cálcio (TOSCANO et al., 2016); (2) produzem vitaminas do complexo B (LI et al., 2016); (3) estimulam a atividade imunomodulatória (REN et al., 2015); (4) reduzem colesterol sérico (KUMAR et al., 2012); (4) aumentam a saúde da pele (CARAMIA et al., 2008); (5) controlam e previnem infecções no trato reprodutivo e urinário (ROSSI et al., 2010); e (6) previnem contra infecções no trato respiratório (HOJSAK et al., 2010). É importante notar que os benefícios à saúde são cepa-específicos e não específicos de espécies ou gêneros. Portanto, nenhum probiótico fornecerá todos os benefícios propostos, nem mesmo os da mesma espécie. Do mesmo modo, nem todas as linhagens da mesma espécie serão eficazes contra todos os problemas de saúde (FIGUEROA-GONZÁLES et al., 2011).

Em todos os casos, os efeitos benéficos são obtidos apenas quando o micro-organismo alcança o local apropriado de atuação, estando metabolicamente ativo e em quantidade suficiente para exercer sua função. Por ser o trato gastrointestinal o principal local de ação, existem muitos fatores que afetam a sobrevivência desses micro-organismos, como o nível de

acidez do estômago, o tempo de exposição ao ácido clorídico, a concentração de sais biliares, o nível da atividade da hidrolase de sal biliar e as espécies e linhagens utilizadas (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2011).

Inicialmente, os probióticos devem atravessar o ambiente ácido do estômago. Este é o ponto onde a maior perda da viabilidade é esperada devido ao alto nível de acidez. No geral, o pH estomacal varia entre 1 e 2,5, podendo chegar até pH 5,0 em determinadas situações. Em adição ao ácido, a pepsina também está presente, auxiliando na degradação das proteínas (COOK et al., 2012). Um segundo componente de estresse é a presença dos sais da bile, que provocam o comprometimento da membrana plasmática dos micro-organismos, devido ao seu caráter anfifílico. No entanto, uma característica funcional específica dos probióticos é a capacidade de resistir o sal biliar via hidrolase. As hidrolases bacterianas clivam a porção glicina ou taurina dos sais biliares conjugados, tornando este último menos bacteriostático (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). Por sua vez, os sais biliares acrescidos da pancreatina são responsáveis por mais de 35% da perda da viabilidade (KONG; SING, 2008).

As linhagens probióticas requerem uma matriz específica para garantir a sobrevivência ao longo do trato gastrointestinal. O foco nas pesquisas está na caracterização dessas novas linhagens e em como a matriz alimentar interage com os micro-organismos (BAKR et al., 2015). Vários produtos não lácteos, tais como soja (IÇIER et al., 2015), cereais (SALMERÓN; THOMAS; PANDIELLA, 2015), frutas (PERRICONE et al., 2014), vegetais (CORONA et al., 2016) e produtos à base de carne (CAVALHEIRO et al., 2015) têm sido utilizados como transportadores de probióticos para o homem.

Segundo os dados do Research and Markets (2016), o mercado global de probióticos deverá totalizar renda de US\$ 50,0 bilhões até 2020, com uma taxa anual de crescimento de 8,0 %. Por sua vez, a evidência de aceitação mundial é refletida nos dados da Euromonitor (2016) que mostram um aumento no consumo de probióticos, entre 2015 e 2020, de 26% na América do Sul (NATURAL PRODUCT INSIDER, 2016). De acordo com Transparency Market Research (2018), estima-se que a receita global gerada pelo mercado de probióticos seja avaliada em cerca de US\$ 6.762,2 milhões no final de 2018 e deverá aumentar a uma taxa de 8,3 % ao longo do período de previsão. O mercado global de probióticos deve ser avaliado em aproximadamente US\$ 12.753,4 milhões até o final de 2026. Algumas das principais empresas que operam no mercado global de probióticos são a Chr. Hansen Holding A/S, BioGaia AB, Probi AB, Nestlé SA, DowDuPont Inc., Procter & Gamble, Probiotics

International Limited, Lallemand Inc., Pfizer Inc., PharmaCare Laboratories, Dr. Willmar Schwabe Group, SymbioPharm GmbH e outras.

3.2.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus é uma espécie de bactéria láctica originalmente classificada como subespécie de *Lactobacillus casei* (ORLA-JENSEN, 1919). Porém, estudos taxonômicos (HANSEN; LESSEL, 1971) e genotípicos (TYNKKYNEN et al., 1999) confirmaram diferenças entre as espécies e colocaram *L. rhamnosus* como espécie distinta de *L. casei*. *Lactobacillus rhamnosus* tem sido isolada dos mais diversos habitats, como por exemplo, trato intestinal humano, cavidade vaginal, oral e produtos lácteos. Tal adaptabilidade confere a este micro-organismo a classificação de generalista (DOUILLARD et al., 2013).

Esta espécie tem recebido o termo de Presunção Qualificada de Segurança e, tendo um longo histórico de uso seguro, ela é considerada GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pelo Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health (CDC, 2018). A ANVISA também aprova o uso da espécie *L. rhamnosus* como probiótico, porém sem especificar a linhagem (BRASIL, 2002). Uma das linhagens mais documentadas e utilizadas comercialmente é *L. rhamnosus* GG, que foi isolada do intestino humano e caracterizada extensivamente.

L. rhamnosus contém um genoma de 3,0 Mbp, estando entre os maiores das bactérias lácticas. É heterofermentativo facultativo (MORITA et al., 2009) e cerca de 74% de todos os isolados desta espécie podem, parcialmente ou totalmente, utilizar L-ramnose, um hidrato de carbono do qual deriva o nome da espécie (DOUILLARD et al., 2013). Muitas linhagens desta espécie possuem a capacidade de persistir na mucosa intestinal humana, uma vez que produz *pili*, que são proteínas presentes na membrana com função de adesão e reprodução (KANKAINEN et al., 2009). A maioria das linhagens de *L. rhamnosus* é resistente à bile e a diferença nos perfis de resistência está relacionada com o nicho e o tipo de linhagem (PITINO et al., 2010; DOUILLARD et al., 2013).

Porém, ainda que a espécie *L. rhamnosus* se enquadre em alguns dos critérios de classificação para ser chamada de probiótico, as linhagens devem ser bem caracterizadas. Sabe-se que o efeito funcional é cepa-específico e, por causa disso, nem todas as linhagens de *L. rhamnosus* serão resistentes à bile ou terão capacidade de aderir ao tecido epitelial, por

exemplo. Em diversos trabalhos, a linhagem ATCC 7469 tem sido relatada como probiótico por possuir características funcionais que a enquadram como tal. *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresentou maior resistência à compostos fenólicos quando comparada com patógenos entéricos (LACOMBE et al., 2012, 2013). Esta linhagem está relacionada com atividade antimicrobiana contra *Shigella dysenteriae* (MOORTHY et al., 2009), *Escherichia coli* (CHANG; LIEW, 2012) e *Candida albicans* (DE OLIVEIRA et al., 2017).

L. rhamnosus ATCC 7469 apresentou habilidade de adesão às células epiteliais da mama bovina e ação antimicrobiana contra patógenos causadores de mastites (*Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus xylosus*) (DIEPERS et al., 2017). Bem como, demonstrou elevada atividade imunomodulatória contra patógenos entéricos (DE OLIVERIA et al., 2017).

Por ser uma espécie amplamente utilizada, *L. rhamnosus* tem sido estudada em sucos de frutas (RANDAZZO et al., 2013; MOREIRA et al., 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016). Mais especificamente, a linhagem ATCC 7469 foi estudada por Farias; Soares; de Andrade, (2016) e Santos; Andrade; de Andrade, (2017) no suco do Maracujá da Caatinga. Enquanto Andrade, (2017) analisou a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 no suco de goiaba.

3.3 Alimentos funcionais

Durante os últimos anos, as indústrias de alimentos vêm percebendo uma mudança na preferência dos consumidores por alimentos que contribuem diretamente para sua saúde, além de promover a sensação de bem-estar. Por conta disso, os consumidores de alimentos têm dado preferência a produtos que contenham ingredientes com potencial de fortalecer o organismo e ao mesmo tempo prevenir e combater doenças, ou seja, alimentos ricos em nutrientes com diferentes propriedades funcionais (SOUSA et al., 201). Dessa maneira, tem-se chamado de alimentos funcionais aqueles que, além prover as funções básicas nutricionais, afetam positivamente uma ou mais funções fisiológicas do organismo, favorecendo a saúde, melhorando a qualidade de vida e auxiliando na redução de riscos de enfermidades (SILVA et al., 2016).

No Brasil, a legislação nº 18 e 19 de 30/04/1999, aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não define o termo “alimentos funcionais”, mas sim alegação de propriedade funcional que é “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”; e alegação de propriedade de saúde que “é aquela que

afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde”.

A ANVISA define quais são os ingredientes que podem ser classificados como funcionais: fontes de fibras (inulina, frutooligosacarídeos, polidextrose, beta glucana, dextrina resistente, betaglucana, lactulose, entre outros), fitoesteróis, ácidos graxos, ômega 3, além disso, a quitosana, o psillium, produtos com proteína de soja e probióticos (BRASIL, 2002). Por ser considerada uma nova tendência do mercado alimentício, os alimentos funcionais tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos, com o emprego de tecnologias para obtenção de produtos com alto valor agregado (SOUSA et al., 201). Segundo Santos et al. (2016), o ingrediente funcional mais utilizado na indústria alimentícia, após as fibras alimentares, foram os probióticos.

Novas categorias de produtos e matérias-primas, no que diz respeito aos probióticos, são certamente os principais alvos das pesquisas para os mercados de alimentos funcionais. As atuais tecnologias e inovações incluem encontrar soluções para a estabilidade e viabilidade dos micro-organismos em novos meios alimentares, como frutas, cereais e vegetais (SHORI, 2016).

Os alimentos fermentados de origem vegetal estão cada vez mais sendo considerados veículos para a liberação de bactérias probióticas. O alto nível de nutrientes benéficos em frutas e vegetais como antioxidantes, vitaminas, fibras dietéticas e minerais, assim como, a tendência atual do vegetarianismo e uma alta prevalência de intolerância à lactose em muitas populações ao redor mundo, poderia torná-los substratos ideais para probióticos (PERES et al., 2012).

É fundamental a escolha de um veículo alimentício apropriado para as linhagens probióticas, bem como a verificação da compatibilidade e adaptabilidade entre as linhagens selecionadas e o referido veículo. Entretanto, é importante salientar que um produto probiótico deve conter uma ou mais linhagens definidas e bem caracterizadas, no sentido de compreender os fatores determinantes sobre a funcionalidade probiótica e os benefícios do hospedeiro, já que os efeitos probióticos são específicos para determinadas linhagens em especial. A seleção de linhagens probióticas deve ser direcionada aos efeitos desejáveis para o produto específico ou para a população-alvo daquele produto (GAWKOWSKI; CHIKINDAS, 2013)

A eficácia medicinal dos produtos alimentares contendo probióticos depende do número de células viáveis por grama ou mililitro do produto no momento do consumo. É

essencial garantir uma elevada taxa de sobrevivência dos probióticos durante a produção, bem como durante a vida útil do produto, a fim de manter a confiança do consumidor nos produtos probióticos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Por fim, a avaliação sensorial na presença de probióticos em determinados alimentos, como, por exemplo, em sucos de frutas, tem importância comercial vital. É necessário compreender o impacto sensorial que culturas probióticas têm em sistemas não leitosos e como a fortificação probiótica influencia a aceitação do consumidor, em termos de aparência, aroma, textura ou sabor (GRANATO et al., 2010).

3.3.1 Sucos de fruta como veículos para probióticos

A adição de probióticos em sucos de frutas tem sido considerada um desafio na área alimentícia, já que as frutas podem combinar efeitos nutricionais com o valor agregado do probiótico, bem como apresentam boa aceitabilidade por possuir sabor atraente e diversificado (PERRICONE et al., 2015). São ricos em açúcar, minerais e vitaminas, que podem ser usados pelos probióticos, e não necessitam de culturas iniciadoras para competir pelos nutrientes (SHAH et al., 2010). Além disso, os sucos contêm naturalmente ou são suplementados com eliminadores de oxigênio, a exemplo do ácido ascórbico, que promove condições anaeróbicas ao meio (NUALKAEKUL; SALMERON; CHARALAMPOPOULOS, 2011).

Devido à variedade da composição química dos sucos e a influência na sobrevivência dos probióticos, a suplementação com estes micro-organismos deve ser melhor estudada. Um importante critério deve ser considerado quando se pretende comercializar sucos de frutas contendo probióticos: a viabilidade até o final do tempo de prateleira (SHORI, 2016). A identificação dos fatores que podem influenciar a viabilidade são pH, presença de peróxido de hidrogênio e oxigênio dissolvido, concentração de metabólitos como ácidos lático e acético, temperatura de armazenamento, natureza dos ingredientes adicionados, tipo de matriz alimentar e, principalmente, tipo de linhagem utilizada (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

A sobrevivência de linhagens probióticas tem sido estudada em diferentes tipos de sucos de frutas (Tabela 1).

Tabela 1 - Viabilidades de *Lactobacillus* spp. em sucos de frutas durante armazenamento refrigerado.

| Linhagem | Fruta | Viabilidade (Log UFC/mL) | Tempo de armazenamento | Referência |
|---|----------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <i>L. casei</i> B442 | Caju | Aumentou de 8,4 até 8,8 Log UFC/mL | 28 Dias | Pereira et al. (2013) |
| <i>L. casei</i> B442 | Abacaxi | Aumentou de 7,4 até 8,6 Log UFC/mL | 28 Dias | Costa et al. (2013), |
| <i>L. reuteri</i> DSM 20016 | Maçã | Reduziu de 8,3 até 7,3 Log UFC/mL | 36 dias | Perricone et al. (2014) |
| | Abacaxi | | 42 dias | |
| | Laranja | | 55 dias | |
| | Frutas vermelhas | | 1 dia | |
| <i>L. plantarum</i> DSMZ 20179 | Pêssego | Reduziu de 8,7 para 5,8 Log UFC/mL | 28 dias | Pakbin et al. (2014) |
| <i>L. delbrueckii</i> DSMZ 15996 | | Reduziu de 9,1 para 7,3 Log UFC/mL | 28 dias | |
| <i>L. casei</i> DSMZ20011 | | Reduziu de 8,7 para 4,9 Log UFC/mL | 7 dias | |
| <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> | Maçã | Reduziu de 8,2 para 5,7 Log UFC/mL | 28 dias | PIMENTEL et al., (2015) |
| <i>L. plantarum</i> ATCC 20174 | Cereja | Reduziu de 8 até 3 Log UFC/mL | 28 dias | NEMATOLLAHI et al., (2016) |
| <i>L. casei</i> ATCC 393 | | Reduziu de 8 até 3 Log UFC/mL | | |
| <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 | | Reduziu de 8 até 1 Log UFC/mL | | |
| <i>L. rhamnosus</i> GG | Manga | Aumentou de 8,3 até 9,0 Log UFC/mL | 30 dias | MOREIRA et al., (2016) |
| <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 | Maracujá da Caatinga | Não ocorreu redução | 28 dias | SANTOS et al., (2017) |
| <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 | Goiaba | Reduziu de 9,0 até 8,0 Log UFC/mL | 28 dias | ANDRADE, (2017) |

Os trabalhos descritos na Tabela 1 exemplificam a influência do tipo de fruta na viabilidade de linhagens probióticas. É possível verificar que a mesma linhagem pode aumentar ou reduzir a viabilidade quando mantida em sucos diferentes (PEREIRA et al., 2013; COSTA et al., 2013). O conhecimento sobre a composição do suco de fruta é essencial para o desenvolvimento de bebidas contendo probióticos. O suco de frutas vermelhas, por exemplo, possui elevado teor de compostos fenólicos (PERRICONE et al., 2014). Estes compostos estão relacionados com maior redução na viabilidade das bactérias probióticas por ter ação bactericida. Além disso, as linhagens probióticas são mais sensíveis às condições ácidas dos sucos (PERRICONE et al., 2015).

3.3.1.1 Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.)

Dentro do gênero *Passiflora*, cerca de 200 espécies são originárias do Brasil, das quais 50 a 60 espécies produzem frutos comestíveis. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (Maracujá amarelo ou azedo) é a espécie mais cultivada no Brasil, seguida de *Passiflora alata* Curtis (Maracujá doce) e *Passiflora quadrangulares* (Maracujá gigante) (LIMA; CUNHA, 2004). Embora as pesquisas com maracujazeiros estejam amplamente dirigidas às espécies cultivadas e, principalmente, a *P. edulis*, existem várias espécies silvestres com potencial agrônomo que não têm recebido atenção da pesquisa, como, por exemplo, *Passiflora cincinnata* Mast., de ocorrência espontânea na região semiárida do Nordeste brasileiro (ARAÚJO et al., 2008).

P. cincinnata Mast, conhecida popularmente como Maracujá da Caatinga, Maracujá do mato, Maracujá-mochila, Maracujá-brabo ou Maracujá de casca verde, é uma espécie que apresenta poliformismo quanto ao tamanho de frutos, ao colorido da flor, cor e gosto do suco (Figura 2) (ARAÚJO, 2007). O fruto apresenta casca de coloração verde-palha sem brilho, de longa durabilidade, resistência ao transporte e manuseio, e sabor bem distinto quando comparado aos frutos do maracujazeiro-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

Figura 2 - Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.).



Fonte: <https://sfagro.uol.com.br/>(2017).

Maracujá da Caatinga é uma espécie perene que ocorre frequentemente na Caatinga do Nordeste. É uma planta trepadeira, de gavinhas axilares, que necessita de suporte para enramar. É bastante resistente às secas periódicas e se desenvolve na maioria dos solos argilo-silicosos ou sílico-argiloso, mas parece aceitar qualquer tipo de solo (ARAÚJO et al., 2004).

As sementes do Maracujá da Caatinga são consideradas boa fonte de óleo vegetal, apresentando elevado teor de proteínas e lipídeos, que pode ser utilizado na indústria alimentícia e, principalmente, farmacêutica e cosmética (ARAÚJO et al., 2010). A polpa apresenta pH próximo a 3,1, coloração amarelo-clara a esbranquiçada e brix variando de 8 a 13 °Brix. O rendimento da polpa é em torno de 35%, quando extraída manualmente com peneira, e de 50% quando extraída em despulpadora rotativa (ARAÚJO et al., 2016).

Na região Nordeste, o Maracujá da Caatinga é comercializado na entressafra do Maracujá-amarelo, apresentando uma excelente opção de renda para os pequenos agricultores, uma vez que se trata de uma espécie adaptada às condições locais de cultivo, por ser nativa da região (OLIVEIRA et al., 2010). A espécie tem despertado interesse devido ao potencial uso como porta-enxerto na propagação do maracujazeiro-amarelo (ARAÚJO et al., 2004), considerando sua resistência a patógenos sistêmicos como o *Fusarium* (ARAÚJO et al., 2012). A vantagem do cultivo desta espécie é sua natureza perene e sua resistência à seca, pois se desenvolve em diversos solos do clima semiárido, isto é, em condições absolutas de sequeiro (ARAÚJO et al., 2012).

Além disso, essa espécie tem contribuído de forma importante em programas de melhoramento vegetal. Araújo et al. (2008) analisaram a divergência genética entre acessos de *P. cincinnata* e concluíram a existência de variabilidade entre os acessos avaliados. Da mesma maneira, Souza et al. (2012) relacionaram que a variabilidade genética entre os acessos do Maracujá da Caatinga pode possibilitar seu uso como genitores divergentes com relação às características físicas e químicas dos frutos.

Recentemente, a Embrapa Semiárido em parceria com a Embrapa Cerrado lançou a cultivar BRS Sertão Forte, fruto do melhoramento genético de acessos silvestres de *Passiflora cincinnata* Mast. de diferentes origens. A nova cultivar apresenta como características de destaque uma maior tolerância ao estresse hídrico e o longo ciclo produtivo, quando comparado às cultivares de maracujazeiro-amarelo disponíveis no mercado (ARAÚJO et al., 2016).

Em comparação às plantas silvestres do maracujazeiro (*Passiflora cincinnata*), o Maracujá da Caatinga BRS Sertão Forte apresenta maior produtividade e maior tamanho e rendimento dos frutos, de forma a ter melhor aceitação no mercado (EMBRAPA, 2016). Nas condições climáticas do estado de Pernambuco e no Cerrado do Planalto Central, este fruto melhorado geneticamente tem produzido de 18 a 29 t/ha/ano em polinização aberta e, dependendo das condições de manejo da cultura, pode atingir produtividade acima de 30 t/ha no primeiro ano de produção (EMBRAPA, 2016).

O Maracujá da Caatinga apresenta grande importância como espécie proveniente do extrativismo para complementação de renda de agricultores familiares, mediante a agregação de valor ao produto processado da polpa na forma de sucos (FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; ANDRADE, 2017; SANTOS; ANDRADE; GOUVEIA, 2017), geleias (CASTRO; RYBKA, 2016; RYBKA et al., 2015), iogurte (SOUZA et al., 2013), molho (TORREZAN et al., 2015), doces (ZUCARELI et al., 2009; ARAÚJO et al., 2016). 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). Pouco se tem publicado, em artigos científicos, dessa fruta. A EMBRAPA detém a maior parte das publicações acerca do Maracujá da Caatinga.

3.4 Encapsulação

A encapsulação consiste numa técnica de empacotamento que envolve a elaboração de microcápsulas circundando pequenas partículas de sólidos, gotículas de líquidos ou dispersões de sólidos em líquidos numa matriz polimérica, permitindo a liberação controlada das substâncias ativas de uma forma direcionada ou sob condições específicas (LAM; GAMBARI, 2014). O processo de encapsulação tem sido aplicado em diferentes áreas, incluindo a farmacêutica, agrícola, terapêutica e alimentícia, sendo o seu principal objetivo proteger os ingredientes ativos do núcleo contra fatores ambientais externos, tais como acidez, alcalinidade, evaporação, calor, oxidação, luz ou umidade (RATHORE et al., 2013).

As cápsulas podem ser de tamanho nanométrico (nano-encapsulamento), micrométrico (microencapsulação) ou milimétrico. A substância encapsulada pode ser chamada de núcleo, preenchimento, fase ativa ou interna, enquanto que a substância que encapsula o agente ativo pode ser chamada de revestimento, membrana, cápsula, material de suporte ou fase externa (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

A encapsulação apresenta diversas aplicações na indústria de alimentos, podendo ser utilizada para proteger o material encapsulado do ambiente externo, evitando sua degradação; para liberação controlada do material ativo; para controlar reações oxidativas; mascarar sabor, cor ou odor desagradável; isolar componentes que reagem com outros dentro da matriz do alimento; prolongar a vida útil e proteger o valor nutricional (BOSCARIOLI, 2010; MENEZES et al., 2013)

No que diz respeito aos probióticos, a imobilização celular por encapsulação ou aprisionamento envolve o revestimento ou o aprisionamento de células microbianas dentro de um material polimérico para produzir condições que são permeáveis à nutrientes, gases e metabólitos, mantendo a viabilidade celular dentro das cápsulas. Dependendo do tipo de aplicação, as células microbianas podem ser encapsuladas para fins de isolamento, proteção e/ou liberação controlada, por exemplo, ao longo do trato gastrointestinal (BURGAIN et al. 2011; RATHORE et al. 2013). No presente trabalho, a encapsulação de *L. rhamnosus* foi aplicada com a intenção de prolongar a viabilidade do probiótico no suco do Maracujá da Caatinga.

Diferentes tipos de mecanismos podem ser utilizados para acionar a liberação das cápsulas em áreas específicas do organismo, tais como alteração de pH, ruptura mecânica, temperatura, ação enzimática, força osmótica, dentre outras (BURGAIN et al., 2011; COOK et al., 2012). O confinamento destas células proporciona um obstáculo entre os probióticos e

as condições ambientais severas, protegendo contra danos mecânicos e químicos, mantendo relativo crescimento e atividade metabólica do microrganismo por um período maior de tempo (CHAMPAGNE et al., 2011; MENEZES et al., 2013; RATHORE et al. 2013).

Além dos benefícios causados pela encapsulação de probióticos, alguns obstáculos podem estar relacionados com a perda da viabilidade das células encapsuladas. A imobilização pode resultar em mudanças nas propriedades físico-químicas do microambiente em que as células microbianas se encontram, tais como a presença de cargas iônicas, acúmulo de metabólitos celular, escassez de nutrientes dentro das cápsulas, atividade de água reduzida, pressão osmótica alterada e tensão superficial modificada (RATHORE et al., 2013).

As microesferas são quase exclusivamente produzidas utilizando polímeros solúveis em água que proporcionam um elevado grau de permeabilidade para nutrientes e metabólitos de baixo peso molecular, proporcionando assim condições ótimas para o funcionamento de células microbianas imobilizadas (COOK et al., 2012). É essencial que o processo de encapsulação seja realizado sob condições relativamente brandas para assegurar a alta viabilidade das células encapsuladas. É também necessário que as microesferas possuam uma boa estabilidade mecânica de modo a suportar o crescimento da cultura em longo prazo (DE VOS et al., 2013).

A escolha correta do material de revestimento é muito importante porque influencia a eficiência de encapsulação e a estabilidade da microcápsula. Alguns fatores devem ser levados em consideração na escolha do material, como: capacidade de selar e manter o material ativo dentro da estrutura durante o processamento ou armazenamento; ser quimicamente não reativo com o material encapsulado e ser de fácil manipulação para o processamento. Vários polímeros são utilizados como matriz encapsulante, como, por exemplo, alginato, carragena, gelatina, carboximetilcelulose, pectina, amido, goma xantana, goma gelana, goma acácia e proteína do soro do leite (BURGAIN et al., 2011; DE VOS et al., 2013; RATHORE et al., 2013; LAM; GAMBARI, 2014; MARTÍN et al., 2015).

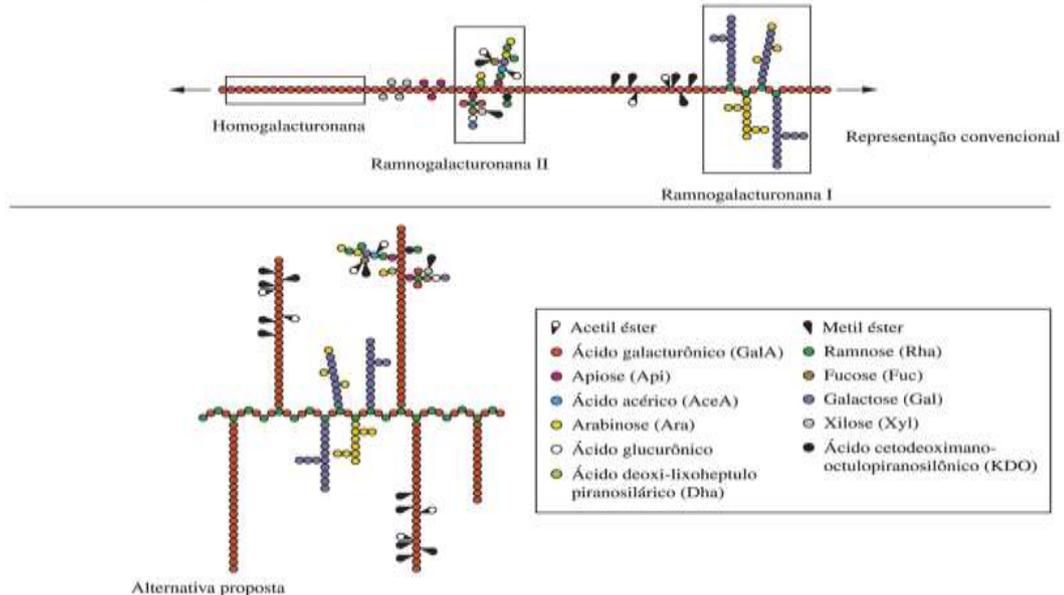
3.4.1 Pectina

As pectinas constituem um grupo de substâncias com expressivo interesse pela indústria de alimentos. Nas últimas décadas, estes compostos vêm sendo utilizados essencialmente como aditivo alimentar, sob a forma de agente espessante e agente geleificante (PATEL; GOYAL, 2012). Foi avaliada e declarada como inofensiva do ponto de vista

toxicológico, pelo JECFA (*Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*). A pectina é geralmente considerada um aditivo alimentício extremamente seguro e seu uso é reconhecido pelo *Codex Alimentarius Internacional*. Nos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) reconhece as pectinas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e no Brasil, a ANVISA, no uso de suas atribuições legais e, considerando que a pectina ocorre naturalmente em frutas, especialmente em frutas cítricas e maçãs, sendo, portanto, parte da dieta normal, tem seu uso permitido pela legislação brasileira (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

A estrutura básica de todas as moléculas de pectina consiste em uma cadeia linear de unidades α -D-ácido galacturônico. Algumas pectinas contêm cadeias de arabinogalactanas ramificadas ou cadeias curtas, compostas de unidades de D-xilose na cadeia de ramnogalactoglicana. Outras pectinas possuem diferentes tipos de cadeias constituídas por ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses (CANTERI et al., 2012). A Figura 3 apresenta uma representação da estrutura da pectina com os diferentes açúcares presentes na composição.

Figura 3 - Ilustração da estrutura da pectina com variados açúcares.

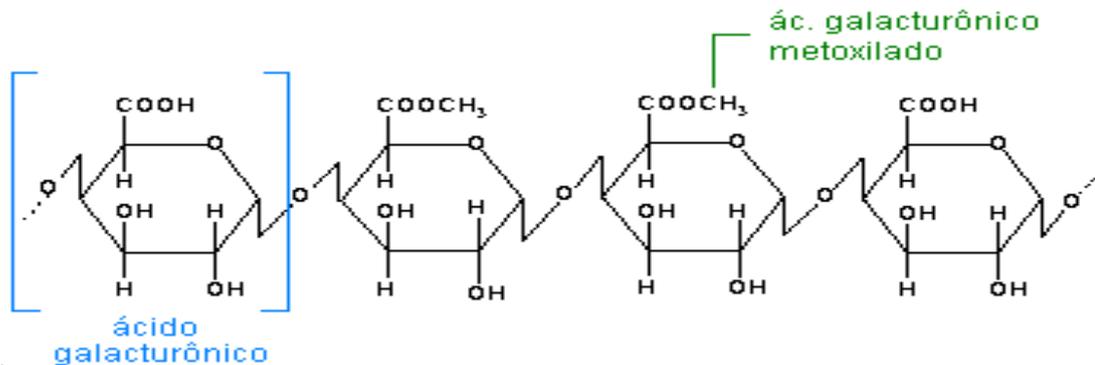


Fonte: Canteriet al. (2012).

As pectinas são subdivididas em função do grau de esterificação ou metoxilação: pectinas de alta esterificação possuem o grau de metoxilação superior a 50 %; pectinas de baixa esterificação têm menos que 50 % da estrutura metoxilada (MENEZES et al., 2015). Em ambos os casos, os grupos carboxilas remanescentes estão presentes como uma mistura na forma de ácidos livres (-COOH) e sais (-COO-Na⁺). O grau de amidação indica a

porcentagem de grupos carboxilas na forma amida. Os graus de metoxilação e de amidação influenciam fortemente as propriedades funcionais, tais como solubilidade, capacidade de gelificação, temperatura e condições de gelificação das pectinas (CANTERI et al., 2012; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura geral da cadeia de ácido-D-galacturônico.



Fonte: <http://www.fcfar.unesp.br> (2018).

A capacidade de formação de géis pela pectina está relacionada à quantidade de grupos polares livres (como as hidroxilas), aos eletrólitos presentes no meio, à concentração da pectina na dispersão, como também, ao grau de metilação (PATEL; GOYAL, 2012). Geis de pectina originam-se através da associação com um polication formado de ligações cruzadas, que geram uma rede cristalina tridimensional onde as moléculas de água e os co-solutos ficam presos em máxima coalescência (MENEZES et al., 2015). As características eletrostáticas e a formação de geis conferem à pectina ótimas propriedades para ser utilizada como material de revestimento na formação de microcápsulas. Há menos informações sobre o uso de pectina como carreador de bactérias probióticas que o alginato.

Muitos trabalhos apresentam a encapsulação de probióticos utilizando pectina em conjunto com outros materiais poliméricos, como: pectina e amido (DAFE et al., 2017), pectina e alginato (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010; ECKERT et al., 2018; VAZIRI et al., 2018), pectina e soro de leite (GEREZ et al., 2011; SOUZA et al., 2012; GEBARA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). Poucos trabalhos citam a encapsulação utilizando apenas pectina (FRAEYE et al., 2010; BRINQUES et al., 2011; VOO et al., 2011; KASTNER et al., 2012; NUALKAEKUL et al., 2013; ZHANG et al., 2016; LARSEN et al., 2018; GHIBAUDO et al., 2017).

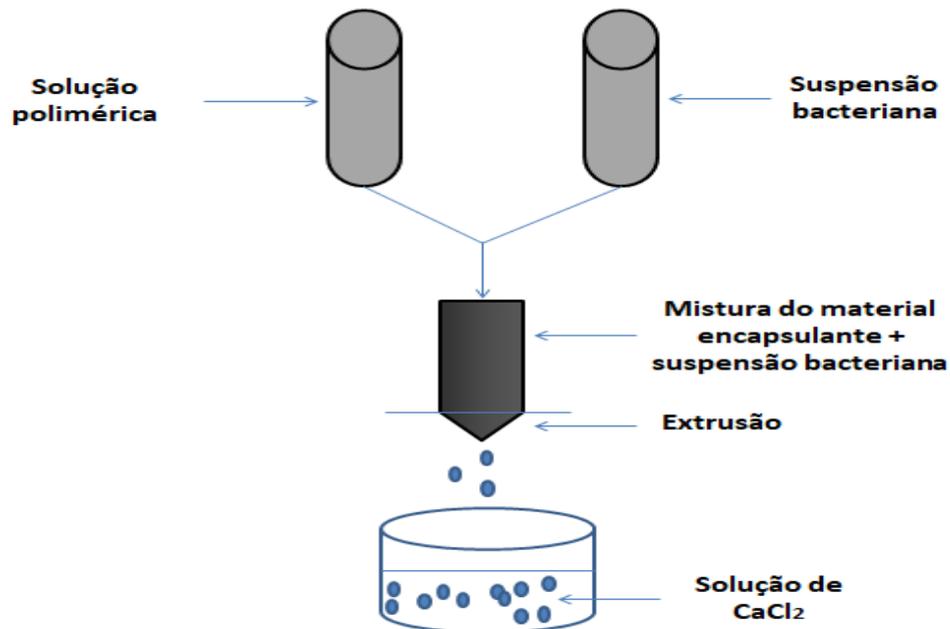
3.4.2 Métodos de encapsulação

Existem várias técnicas disponíveis para encapsulação de compostos alimentares. A escolha do método depende da aplicação que será dada à microcápsula (DE VOS et al., 2010). Muitas tecnologias baseiam-se na secagem, desde que a maioria dos compostos ativos está sob a forma líquida. Diferentes técnicas como secagem por atomização (*spray drying*), secagem em leito fluidizado (*spray-bed-drying*), revestimento em leito fluidizado (*fluid-bed coating*), atomização a frio (*spray-chilling*) e injeção por fusão (*melt injection*) são disponíveis para encapsular (NEDOVIC et al., 2011). No entanto, estas técnicas podem não ser adequadas para encapsulação de probióticos, pois requer a aplicação de altas temperaturas e solventes orgânicos, o que pode ser prejudicial aos micro-organismos (SANTOS; FINKLER, 2014).

Existem técnicas amplamente conhecidas que não usam a secagem como forma de encapsulação, como a emulsão, coacervação e extrusão. A emulsão é definida como um processo de dispersão de um líquido, contendo o agente ativo, num segundo líquido imiscível. Existem duas combinações dependendo do tipo de material a ser encapsulado: emulsões água/óleo ou emulsões óleo/água e água/óleo/água para emulsões duplas (DE VOS et al., 2010). A técnica de coacervação consiste na separação de uma ou mais fases de polímeros incompatíveis do material de interesse. Essa mudança de fases ocorre pela mudança no pH (adição de ácido ou base), na temperatura ou na composição das soluções (NEDOVIC et al., 2011).

A técnica de extrusão é o método mais popular devido à sua simplicidade, baixo custo e condições de formulação brandas que garantem alta viabilidade celular. A preparação envolve a mistura da solução contendo o agente reticulante, adicionando o composto bioativo e extrusando a suspensão através de uma agulha de seringa numa solução de CaCl_2 , formando as cápsulas (COOK et al., 2012; MARTÍN et al., 2015). Os fatores que podem afetar o tamanho das partículas incluem o diâmetro do orifício da agulha, a viscosidade e fluxo da solução polimérica, a distância entre a agulha e a solução reticulante, a concentração e a temperatura da solução polimérica (COOK et al., 2012). Na Figura 5 pode-se verificar um esquema do processo de encapsulação por extrusão.

Figura 5 - Esquema de encapsulação pelo método de extrusão.



Fonte: Adaptado de Menezes et al. (2015).

A produção de partículas sem a utilização de solventes orgânicos torna a técnica de extrusão crescente e promissora, especialmente para a encapsulação de fármacos, células vivas e para inclusão de compostos de interesse alimentar (PATIL et al., 2010). Uma desvantagem dessa técnica é a formação de cápsulas grandes, variando entre 1 a 3 mm. Para aplicações em alimentos, o diâmetro médio das partículas é uma das características mais importantes. As cápsulas devem ser suficientemente pequenas para evitar um impacto sensorial negativo. Rathore et al. (2013) reportaram que o tamanho ideal para cápsulas contendo probióticos é entre 1 – 1000 μm , pois nessa faixa ocorre difusão eficiente dos nutrientes, oxigênio, bem como, metabólitos. Por sua vez, Heidebach et al. (2009) afirmaram que o tamanho médio desejável para aplicação em alimentos é aproximadamente 100 μm .

Um novo sistema de encapsulação vem sendo aplicado para manutenção de bactérias probióticas encapsuladas, que é o encapsulamento por extrusão seguido da secagem por liofilização (ALBADRAN et al. 2015; TOMÁS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2014; ETCHEPARE et al., 2016; LI et al., 2016; XU et al., 2016; HALIM et al., 2017; MOUMITA et al., 2018). Este é um método em que as cápsulas são submetidas a baixas temperaturas, resultando na formação de cristais de gelo e a sublimação dos cristais de gelo sob pressão reduzida, resultando na formação de produto seco poroso (DOLLY et al., 2011). A liofilização, dentre as técnicas de secagem, é um processo que combina condições brandas de operação, como a temperatura de secagem a vácuo e o congelamento (BROECK et al., 2016).

Além disso, esta é a técnica mais adequada para a desidratação de materiais sensíveis ao calor e materiais biológicos (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

O principal motivo que influencia o uso da liofilização é a diminuição da umidade nas cápsulas. O conteúdo de água (A_w) de partículas probióticas é um fator crítico que pode influenciar a estabilidade da bactéria durante o armazenamento (ETCHEPARE et al., 2016). Apesar de algumas limitações do processo de liofilização a nível industrial, que incluem os custos operacionais e de capital elevado, devido às baixas temperaturas, alto vácuo e longo tempo de residência exigido (BROECKY et al., 2016), a encapsulação de micro-organismos probióticos e secagem em liofilizador em conjunto são alternativas viáveis para manutenção por longos períodos e uso em qualquer veículo alimentar (MARTÍN et al., 2015).

Os trabalhos que estão usando essa abordagem de imobilização celular objetivam, principalmente, aumentar o tempo de viabilidade dos probióticos durante o armazenamento sob diferentes temperaturas, mas sem a adição dos produtos liofilizados em veículo alimentar. No estudo desempenhado por Tomás et al. (2015), os autores estudaram a viabilidade de *L. reuteri* CRL encapsulado com alginato por extrusão e posterior liofilização. As cápsulas com e sem liofilização foram armazenadas em temperatura ambiente e refrigeradas durante 60 dias. Os autores observaram que nas cápsulas sem liofilização as células não estavam mais viáveis em 20 dias de armazenamento, independente da temperatura. Porém, nas cápsulas liofilizadas, *L. reuteri* CRL permaneceu viável apenas na condição refrigerada, apresentando viabilidade acima de 7 Log UFC/mL por 60 dias.

Contudo, quando Halim et al. (2017) encapsularam *L. casei* com alginato, utilizando as mesmas técnicas, ou seja, extrusão seguida de liofilização, os autores verificaram o mesmo padrão de sobrevivência nas cápsulas liofilizadas. Isto é, quando armazenadas sob refrigeração, as células ficaram viáveis por 85 dias, apresentando redução de 40 % na sobrevivência. Porém, quando armazenadas em temperatura ambiente, as células não estavam mais viáveis nesse período. Os autores não analisaram cápsulas não liofilizadas.

Resultados diferentes foram observados por Etchepare et al. (2016) quando liofilizaram cápsulas de alginato contendo *L. acidophilus* e verificaram que a viabilidade permaneceu acima de 6 Log UFC/mL tanto nas cápsulas íntegras quanto liofilizadas armazenadas seja em temperatura ambiente ou refrigeradas por 60 dias.

Por conseguinte, nos estudos desempenhados por Albadran et al. (2015) e Moumita et al. (2018) os autores empregaram outras técnicas de secagem, após a etapa de extrusão, para comparar com a secagem por liofilização. Albadran et al. (2015) analisaram a influência das

técnicas de *fluid bed drying* e *freeze drying* após a encapsulação *L. plantarum* NCIMB 8826 por extrusão, usando alginato e quitosana. Os autores observaram redução de 0,8 e 1,3 log após a secagem por leite fluidizado e liofilização, respectivamente. Entretanto, Moumita et al. (2018) verificaram redução de 0,55 e 0,80 Log quando *Enterococcus faecium* encapsulado com alginato, por extrusão, foi submetido à secagem por liofilização (*freeze drying*) e pulverização (*spray-drying*), respectivamente.

Apesar de a secagem ser aplicada como uma técnica de encapsulação individualizada, na qual os materiais encapsulantes são tidos como crioprotetores (maltodextrina e soro de leite, por exemplo), a incorporação de outros métodos de encapsulação acoplados a secagem favorece o estudo de novos materiais de revestimento na proteção de organismos probióticos, como alginato, carragena, e pectina, por exemplo. O alginato é o principal polissacarídeo utilizado nessa nova abordagem de encapsulação, independente da técnica precedida à liofilização (ALBADRAN et al., 2015; ETCHEPARE et al., 2016; HOLKEM et al., 2016; XU et al., 2016; MOUMITA et al., 2017; HALIM et al., 2017; SÁNCHEZ et al., 2017; MOUMITA et al., 2018). Outros trabalhos usaram gelatina (SILVA et al., 2018) e xantana (TOMÁS et al., 2015) como material encapsulante. Contudo, poucos estudos foram publicados utilizando a pectina como agente encapsulante (SHOJI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014 e LI et al., 2016).

Ribeiro et al. (2014) encapsularam *L. acidophilus* LA-5 pelo processo de extrusão e coacervação usando pectina e soro de leite como material de parede e revestimento, respectivamente. As cápsulas foram, então, liofilizadas e adicionadas ao iogurte para análise da viabilidade. A redução de 0,2 Log foi observada na viabilidade de *L. acidophilus* encapsulado com e sem liofilização, depois de 35 dias de armazenamento refrigerado.

Quando Shoji et al. (2013) encapsularam *L. acidophilus* com pectina, pelo complexo de coacervação seguido da liofilização, observaram redução de 2,53 Log com 120 dias de armazenamento refrigerado (7°C). Porém, a 37°C as células não estavam mais viáveis após 30 dias de armazenamento. Posteriormente, os autores adicionaram as cápsulas liofilizadas ao iogurte e verificaram que a viabilidade permaneceu acima de 7 Log UFC/mL em 28 dias de refrigeração.

No trabalho de Li et al. (2016), *L. rhamnosus* GG foi encapsulado pela técnica de extrusão usando pectina e glicose como material de parede e crioprotetor, respectivamente, e as cápsulas foram liofilizadas. Nesse trabalho, os autores analisaram a influência do crioprotetor na sobrevivência do probiótico após a liofilização e verificaram redução em torno

de 25 % e 10 % da viabilidade nas cápsulas sem e com criprotetor, respectivamente, após o processo.

Como foi dito anteriormente, a maioria dos trabalhos publicados com a nova abordagem de encapsulação objetivou apenas acompanhar a viabilidade dos probióticos durante a estocagem, variando a temperatura de armazenamento, sem a adição do produto funcional em nenhum meio formulado. Somente nos trabalhos de Shoji et al. (2013), Ribeiro (2014), Moumita et al. (2017, 2018) e Tomás et al. (2015, foi visto inclusão dos probióticos em produtos formulados para consumo. Em nenhum destes trabalhos houve a adição dos probióticos em sucos de fruta. Diante disso, o presente trabalho possui caráter inovativo, tal que a viabilidade do probiótico encapsulado é acompanhada em uma matriz alimentar, sendo a bebida à base do Maracujá da Caatinga, o veículo de incorporação das cápsulas produzidas com e sem liofilização.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e processamento dos frutos

Os frutos de *Passiflora cincinnata* Mast. foram provenientes da cidade de Tapiramitá-BA, situada a uma latitude de 11°50'50" sul, longitude 40°47'29" oeste e altitude de 820 metros. Ao chegarem ao Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LABBIO), os frutos foram lavados em água corrente e sabão neutro para a retirada das sujidades e colocados em bancadas para secar naturalmente. Os maracujás foram cortados manualmente com faca de aço inoxidável e, em seguida, o fruto despolpado e desmembrado das sementes com o auxílio de uma peneira. A polpa foi guardada em freezer (- 20 °C) em frascos de vidro esterelizados. Posteriormente, a polpa foi submetida às análises de ART, pH, Ácidos cítrico e málico, proteínas e Brix.

4.2 Micro-organismo

A linhagem de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi adquirida na forma liofilizada da ATCC (American Type Culture Collection, USA). Para a sua ativação e manutenção, a cultura foi reidratada em caldo MRS (Merck, Darmstadt, Germany) e incubada por 24 horas a 37°C. Posteriormente, a suspensão celular foi distribuída em tubos inclinados contendo MRS ágar e reincubada por 24 horas a 37°C. Após esta etapa, a cultura celular foi ressuspensa em glicerol (10 % V/V), distribuída (1 mL) em eppendorf e mantida em freezer a - 20°C.

4.3 Inóculo e fermentação

Para o preparo do inóculo, a cultura mantida em glicerol (10 % V/V) foi transferida para Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de caldo MRS a 37°C durante 24 h. Alíquotas foram retiradas para adição nos meios do Maracujá da Caatinga, os quais foram preparados sob diferentes concentrações de polpa, de acordo com as etapas do estudo. Os meios foram previamente pasteurizados a 65°C por 35 min e, imediatamente colocados em banho de gelo. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH (1M) e as fermentações foram realizadas a 37°C por 24 horas.

4.4 Planejamento experimental

Foi aplicado um Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 com quatro pontos axiais e 2 pontos centrais na replicata, totalizando 10 ensaios, para investigar a melhor condição de cultivo para a relação entre a viabilidade final de *L. rhamnosus* e o pH, assim como a produção de ácido lático. As duas variáveis independentes foram x_1 para concentração do inóculo e x_2 para concentração de polpa (Tabela 2). E as variáveis dependentes foram a viabilidade, pH e concentração de ácido lático. O modelo polinomial gerado em função das duas variáveis, de acordo com as respostas previstas, estão representados na Equação 1.

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

Onde: $i = 1$ e 2

\hat{y}_1 é a razão entre Log (UFC/mL) final e pH; \hat{y}_2 é a concentração de ácido lático.

Tabela 2 - Fatores e níveis do planejamento composto central rotacional.

| Fatores | 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 |

Um estudo cinético foi desempenhado sob as melhores condições de fermentação previstas pelo modelo polinomial. A cinética da fermentação ocorreu a 37°C por 27 horas. Alíquotas foram coletadas para análise de pH, viabilidade, açúcares redutores totais (ART) e ácidos orgânicos (cítrico, málico e lático).

4.5 Incorporação do probiótico na bebida do Maracujá da Caatinga e avaliação do armazenamento refrigerado

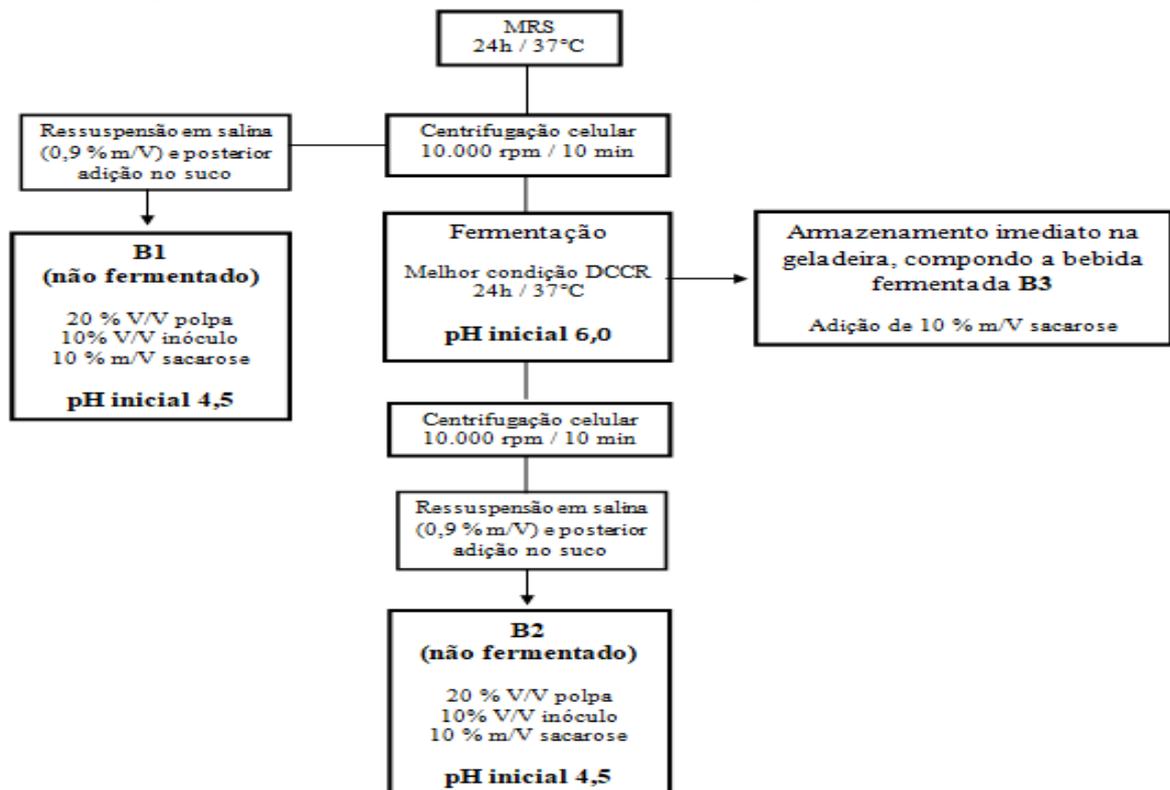
Três sucos probióticos foram formulados e avaliados durante 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C. Os sucos não fermentados B1 e B2 diferiram quanto à origem do inóculo. Ou seja, no suco B1 o inóculo foi proveniente do meio MRS caldo e no

suco B2, o inóculo foi proveniente da uma etapa prévia de fermentação realizada no meio de Maracujá da Caatinga, meio este que foi definido nas melhores condições previstas pelo DCCR. A bebida fermentada B3 foi proveniente da validação do DCCR.

Os sucos não fermentados (B1 e B2) foram elaborados contendo 20 % (V/V) de polpa do Maracujá da Caatinga e 10 % (V/V) de inóculo. É importante citar que estes sucos tiveram composição diferente da definida no DCCR para polpa e inóculo pois precisavam se enquadrar na legislação para sucos de fruta não fermentado. O valor de polpa, nos sucos não fermentados, foi definido de acordo o Padrão de Identidade e Qualidade para Suco Tropical de Maracujá adoçado (BRASIL, 2003). Concomitante, o valor de inóculo foi maior que o previsto pelo DCCR, tal que nestes sucos não houve crescimento microbiano através da fermentação, mas apenas incorporação do probiótico aos sucos. Nas três bebidas (B1, B2 e B3) foram adicionados 10 % (m/V) de sacarose, valor máximo estipulado pela legislação brasileira para bebidas adoçadas (BRASIL, 2009). Foram coletadas amostras para análise da viabilidade, ART, ácidos orgânicos e pH.

Na Figura 6 é apresentado um esquema da metodologia aplicada para elaboração dos sucos.

Figura 6 - Esquema da metodologia aplicada na elaboração dos sucos probióticos contendo células livres.



Fonte: A autora, 2018.

4.6 Produção das cápsulas

4.6.1 Preparo das células para encapsulação

A ativação e o inóculo do micro-organismo seguiram a mesma metodologia descrita nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Após o inóculo em MRS, as células foram centrifugadas à 10.000 rpm (3,468 g) por 10 min e ressuspensas em salina (0,9 % m/V) para posterior adição em pectina.

4.6.2 Preparo das cápsulas pelo método de extrusão

As cápsulas foram preparadas pelo método de extrusão segundo a metodologia de Nualkaekul et al. (2013). Previamente, 1 mL da suspensão celular, produzida como descrito na seção 4.6.1, foi misturada em 9 mL de Pectina Cítrica de baixo grau de metoxilação (Genu®). Antes do uso, as soluções poliméricas foram pasteurizadas a 72°C por 30 min e imediatamente colocadas em banho de gelo, subsequente usada para revestimento. A mistura células/pectina (1 mL) foi extrusada através de uma agulha com diâmetro de 0,7 mm em 10 mL de solução de CaCl₂ (0,15 M) (Vetec). As cápsulas permaneceram na solução por 30 min e depois foram lavadas com água destilada estéril.

Inicialmente, experimentos preliminares de encapsulação foram realizados variando a concentração de pectina: de 0,5 a 5 (% m/V). Após esta etapa, um planejamento experimental foi proposto baseado na condição que apresentou melhor resultado em relação à eficiência da encapsulação. Foi aplicado um Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² com quatro pontos axiais e 2 pontos centrais, totalizando 10 ensaios, para investigar a influência da concentração de pectina e de CaCl₂ na eficiência da encapsulação. As variáveis independentes foram x_1 para a concentração de pectina e x_2 para a concentração de CaCl₂ (Tabela 3). A variável dependente foi a eficiência da encapsulação, determinada no item 4.7. Os dados foram ajustados de acordo com a equação 1 (Item 4.4).

Tabela 3 - Fatores e níveis do segundo planejamento composto central rotacional.

| Fatores | Níveis | | | | |
|-----------------------|--------|------|------|------|-------|
| | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
| Pectina (% m/V) | 3,29 | 3,50 | 4,00 | 4,50 | 4,70 |
| CaCl ₂ (M) | 0,08 | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,22 |

A validação do modelo foi realizada através da análise da eficiência da encapsulação com a melhor condição proposta pelo modelo polinomial gerado.

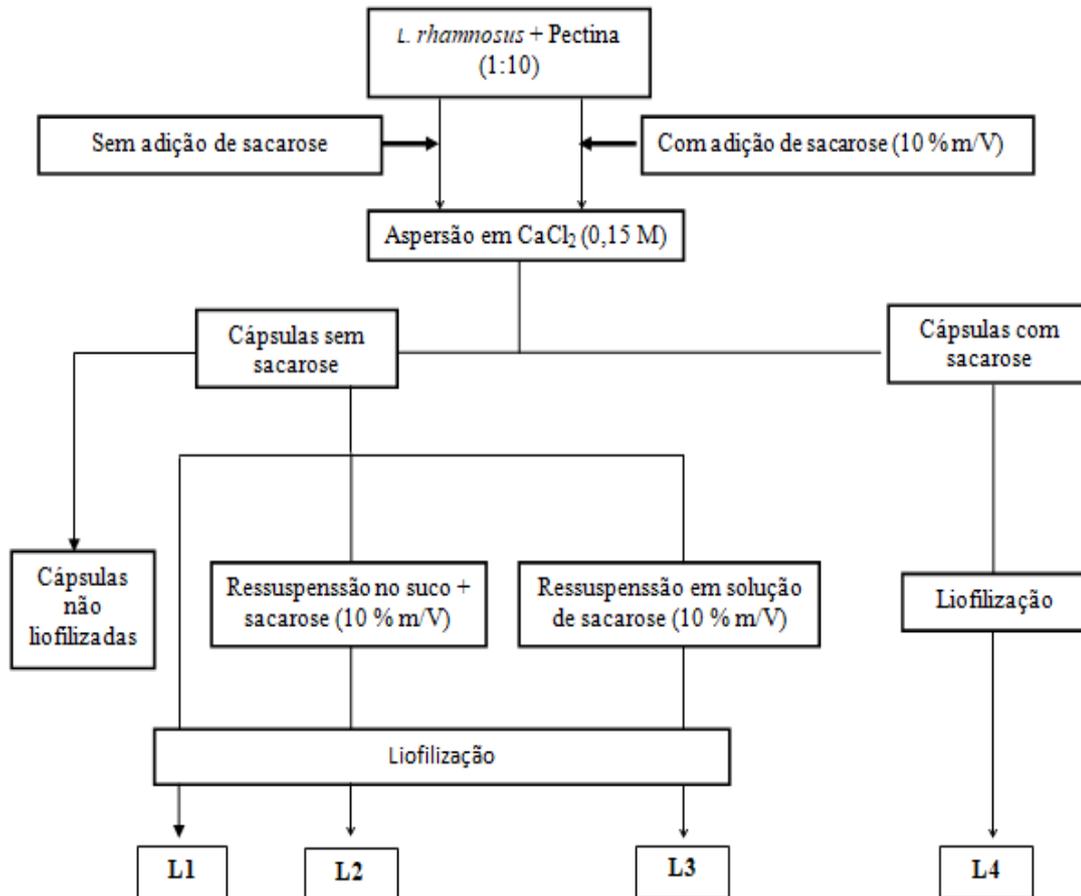
4.6.3 Influência do método de liofilização na viabilidade do probiótico

Após o preparo das cápsulas obtidas pelo método de extrusão, estas foram, posteriormente, submetidas ao processo de liofilização. A etapa de liofilização ocorreu no Laboratório de Bioprocessos, no Centro Acadêmico de Vitória. Para a obtenção de cápsulas liofilizadas, as cápsulas úmidas foram congeladas em freezer a -80°C por 12 horas e, em seguida, liofilizadas a -50°C por 24 horas sob vácuo (1,720 mT) no liofilizador (Virtis SP scientific, Sentry 2.0). Quatro tipos de cápsulas liofilizadas foram elaboradas (L1, L2, L3 e L4), as quais variaram quanto à presença do crioprotetor (L3 e L4) e do suco de Maracujá (L2) na composição. A condição controle foi sem crioprotetor e sem suco (L1).

O suco de Maracujá utilizado na composição das cápsulas liofilizadas L2 foi composto de 20 % (V/V) de polpa e 10 % (m/V) de sacarose. Esta condição foi preparada com o intuito de se ter um suco probiótico instantâneo, isto é, um produto formulado desidratado composto pelo suco funcional. Enquanto, o crioprotetor utilizado nas cápsulas liofilizadas L3 e L4 foi a sacarose (10 % m/V). As cápsulas contendo crioprotetor diferiram quanto ao momento de adição. Na condição L3, as cápsulas de pectina provenientes da etapa de extrusão foram ressuspendidas em solução de sacarose e liofilizadas. No tipo L4, as cápsulas foram preparadas adicionando sacarose à pectina, ainda na etapa de extrusão e, posteriormente, liofilizadas. A formulação das quatro condições é apresentada na Figura 7.

Após a liofilização, as cápsulas liofilizadas (L1, L2, L3 e L4) foram armazenadas em temperatura ambiente e a viabilidade analisada com 0, 30 e 60 dias. A eficiência da liofilização e a viabilidade foram determinadas nos itens 4.7 e 4.8, respectivamente.

Figura 7 - Esquema dos processos de elaboração das cápsulas com e sem liofilização.



Fonte: A autora, 2018.

4.7 Eficiência da encapsulação

As cápsulas de pectina com e sem liofilização foram dissolvidas para determinar a viabilidade e, assim, calcular a eficiência da encapsulação por extrusão, bem como a eficiência da liofilização. Uma massa de 1 g de cápsulas sem liofilização e 0,1 g de cápsulas liofilizadas foram desintegradas em 10 mL de tampão de citrato de sódio (0,1 M) a 37°C e agitação, por 5 min. Uma alíquota da suspensão foi utilizada para o plaqueamento, como descrito no item 4.8. As eficiências, tanto da encapsulação por extrusão quanto da liofilização, foram calculadas de acordo com as Equação 2 e Equação 3, respectivamente.

$$EE = \left(\frac{CV}{CL}\right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$EL = \left(\frac{CS}{CVo}\right) \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

EE e EL representam a eficiência da encapsulação por extrusão e a eficiência da liofilização, respectivamente. CV é o número de células viáveis, em Log, liberadas das cápsulas não liofilizadas, e CL é o número de células livres, em Log, adicionadas à pectina durante a produção das cápsulas, por extrusão. Por sua vez, CS é o número de células viáveis, em Log, liberadas das cápsulas secas após a liofilização, e CV₀ é o número de células viáveis, em Log, contidos nas cápsulas úmidas antes da liofilização.

4.8 Viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469

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 alíquotas foram semeadas em placas de Petri com caldo MRS acrescido de ágar (20 g/L). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas.

4.9 Caracterização das cápsulas

A determinação da umidade das cápsulas com e sem liofilização foi realizada usando-se uma estufa (BUNKER) a 80°C por 24 horas, até peso constante. O tamanho médio das cápsulas não liofilizadas foi determinado através da escolha aleatória de 30 cápsulas, que foram postas sobre um papel preto, as quais foram fotografadas com câmera digital (Canon, EOS 70D) e lente de 100 mm. A escala foi adicionada à imagem digital calibrada usando o software ImageJ1.47v e calculado o tamanho das cápsulas.

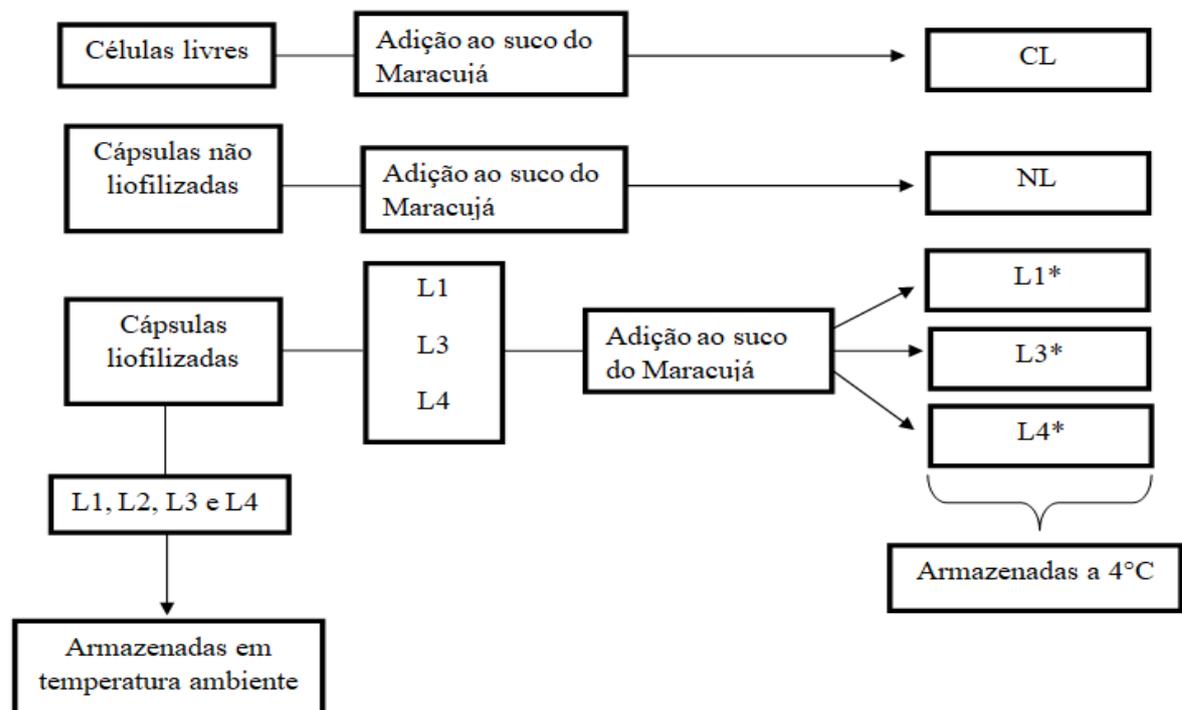
Para a análise da fotomicrografia, as cápsulas não liofilizadas foram coradas com 1 mL de Giemsa concentrado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 1 hora e depois lavadas com água destilada. As cápsulas coradas foram fotografadas usando uma câmera digital (AxioCam ERc5s, Zeiss) acoplada a um microscópio óptico (Primostar, Zeiss), sob imersão em óleo com aumento de 1000x. O estudo microscópico das amostras liofilizadas foi executado em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3030, operado em 15 kV, equipado com um sistema de energia dispersiva de raio-X Quantax70 para microanálise dos elementos constituintes. As amostras foram adicionadas sob uma fita de carbono e avaliadas posteriormente. A análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMat) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.10 Aplicação das cápsulas com e sem liofilização no suco do Maracujá da Caatinga

A fim de avaliar a influência da encapsulação e da liofilização na viabilidade do micro-organismo, as cápsulas com e sem liofilização foram armazenadas durante 120 dias. As cápsulas liofilizadas do tipo L1, L3 e L4 (0,1 g) foram adicionadas em 10 mL do suco do Maracujá da Caatinga (20 % V/V de polpa e 10 % m/V de sacarose) e denominadas L1*, L3*, e L4*. A condição L2 representa o suco funcional instantâneo e não foi armazenado sob refrigeração. A finalidade dele é compor um produto pronto para consumo imediato e não um produto armazenado em geladeira para consumo contínuo.

Para comparar com as cápsulas liofilizadas, 1 g das cápsulas sem liofilização foram adicionadas em 10 mL do suco de Maracujá (20 % V/V de polpa e 10 % m/V de sacarose) e recebeu denominação de NL (não liofilizadas). A condição controle em relação ao encapsulamento foi o suco contendo as células livres (10 % V/V) (CL). Os sucos foram armazenados em geladeira a 4°C. A viabilidade do probiótico, a concentração de ácido lático e o pH foram determinados durante o armazenamento. Um esquema dos sucos probióticos com o micro-organismo encapsulado é apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema do armazenamento das cápsulas com e sem liofilização em temperatura ambiente e refrigerada.



Fonte: A autora, 2018.

4.11 Análises físico-químicas

4.11.1 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 pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNSA), segundo Miller (1959). A determinação dos sólidos solúveis foi feita por refratômetro e o resultado expresso em °Brix. A concentração de proteína foi medida pelo teor de nitrogênio, quantificado pelo método de Kjeldahl (IAL, 2008) e ácidos orgânicos (cítrico e málico) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O pH foi determinado através de potenciômetro (3510, Jenway).

4.11.2 Quantificação dos ácidos cítrico, málico e láctico

Para a quantificação dos ácidos orgânicos (Cítrico, Málico e Láctico), tanto na polpa quanto durante as fermentações e armazenamento, foi utilizado cromatógrafo líquido (M20A, Shimadzu) com as seguintes condições: coluna Biorad HPX-87H⁺, ácido sulfúrico (5 mM) como fase móvel, detecção a 210 nm, vazão de 0,6 mL/min e 28 °C.

4.11.3 Quantificação dos açúcares redutores totais

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).

4.11.4 Determinação do pH

O pH foi determinado através de potenciômetro (3510, Jenway).

4.12 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados de acordo com a Análise de Variância (ANOVA), considerando o nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), usando o Statistica 7 e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, usando o Past.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da polpa do Maracujá da Caatinga

Os resultados obtidos na caracterização da polpa do maracujá da Caatinga são apresentados na Tabela 4 e comparados com o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) estabelecidos para a polpa do Maracujá Amarelo (BRASIL, 2000). Os teores de ART, ácidos cítrico e málico foram obtidos na polpa diluída 10% (V/V), não tendo sido possível quantificar o ácido ascórbico, devido à sua rápida degradação. Estes resultados foram encontrados através da validação realizada por Farias, Soares & Gouveia (2016).

Tabela 4 - Caracterização físico-química da polpa do Maracujá da Caatinga.

| Análises | Presente trabalho | PIQ |
|---------------------|-------------------|-----------|
| pH | 3,0± 0,2 | 2,7 – 3,8 |
| ART (g/L) | 5,0 | 18,0** |
| °Brix | 13,5 | 11,0* |
| Proteína (%) | 1,2*** | - |
| Ácido cítrico (g/L) | 45,8 | - |
| Ácido Málico (g/L) | 8,6 | - |

*valores mínimos aceitáveis; ** valor máximo aceitável para açúcares totais; *** Teor de N g/100g; PIQ: Padrão de Identidade e Qualidade para polpa de maracujá.

Segundo Campos (2010), as características físico-químicas de frutas do gênero *Passiflora* podem ser influenciadas por fatores como maturação da fruta, idade das plantas, condições climáticas, estado nutricional, polinização, fertilização do solo e época de colheita. Esta afirmação pode ser corroborada por Pita (2012) e Zeraik et al. (2010) que encontraram valores diferentes para o ácido cítrico e málico de 95,1 g/L e 3,85 g/L, respectivamente. Por sua vez, Araújo et al. (2008) encontraram, na caracterização do Maracujá da Caatinga, valores de ART e °Brix iguais a 7,83 e 14,2, respectivamente.

O ácido cítrico é o acidulante mais comum em alimentos produzidos em escala industrial. Altas concentrações de ácido cítrico diminuem a necessidade da adição de acidificantes, por causa disso, não há uma quantidade definida na legislação (BRASIL, 2013). A concentração de ácido cítrico necessária em bebidas de fruta depende do efeito tecnológico desejado, desde que não altere a identidade e a genuinidade do produto. Da mesma forma, o ácido málico também não tem concentração definida na legislação para bebidas de origem

vegetal, como polpa e suco de fruta. O ácido málico é o segundo ácido mais abundante em frutas e é um dos responsáveis pelo sabor e aroma do produto (SEQUEIRA, 2012).

5.2 Avaliação das quantidades mais adequadas de polpa e inóculo para fermentação do Maracujá da Caatinga

O DCCR foi aplicado a fim de investigar a melhor condição para o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 na bebida do Maracujá da Caatinga. Os valores de inóculo e polpa foram selecionados de acordo com experimentos preliminares realizados por Farias, Soares & Gouveia (2016). As condições do planejamento experimental e as respostas da razão entre viabilidade e pH e ácido láctico estão descritos na Tabela 5 e os valores de pH, ART, viabilidade e ácido láctico de cada ensaio podem ser evidenciados na Figura 9.

As razões entre a viabilidade final e o pH (RVpH) foram analisadas devido a relação do crescimento bacteriano em ambiente ácido, condição esta que já foi estudada por alguns autores em sucos de fruta (SILVEIRA et al., 2010; NUALKUEKUL et al., 2011; ELLENDERSEN et al., 2012; COSTA et al., 2013; PEREIRA et al., 2013). Os ensaios 4, 6, 9 e 10 foram os que apresentaram maior razão (RVpH), tendo baixos valores de pH, alta viabilidade e concentração de ácido láctico. Por outro lado, os ensaios 1, 5 e 7 foram os que apresentaram menor razão, assim como, menor concentração de ácido láctico (Tabela 5). A diminuição do pH durante as fermentações está relacionada, principalmente, a produção de ácido láctico, principal produto do metabolismo de bactérias lácticas (DIBNER; BUTTIN, 2002).

Tabela 5 - Condições do planejamento experimental e as respostas da razão entre viabilidade e pH e ácido lático.

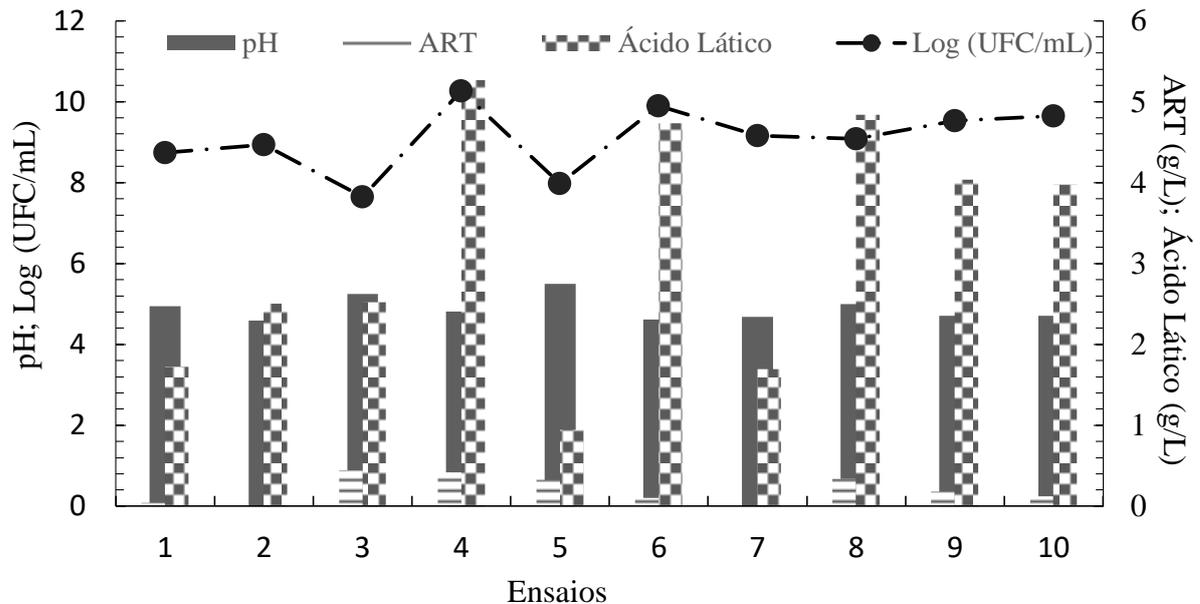
| Ensaio | Inóculo (% V/V) | Polpa (% V/V) | RVpH | Ácido Lático (g.L ⁻¹) |
|--------|-----------------|---------------|------|-----------------------------------|
| 1 | 0,50 | 5,00 | 1,77 | 1,73 |
| 2 | 2,50 | 5,00 | 1,95 | 2,52 |
| 3 | 0,50 | 15,00 | 1,46 | 2,51 |
| 4 | 2,50 | 15,00 | 2,13 | 5,27 |
| 5 | 0,09 | 10,00 | 1,45 | 0,95 |
| 6 | 2,91 | 10,00 | 2,14 | 4,74 |
| 7 | 1,50 | 2,95 | 1,96 | 1,70 |
| 8 | 1,50 | 17,05 | 1,82 | 4,84 |
| 9 | 1,50 | 10,00 | 2,05 | 4,04 |
| 10 | 1,50 | 10,00 | 2,17 | 3,98 |

RVpH: Razão entre viabilidade e pH.

Pode-se verificar que as maiores viabilidades foram encontradas nos ensaios de maior produção de ácido lático, após 24 horas de fermentação (Figura 9). Nos ensaios 4 e 6 a viabilidade foi 10,27 Log UFC/mL e 9,9 Log UFC/mL, respectivamente. Já nos ensaios 9 e 10, a viabilidade foi de 9,53 e 9,65 Log UFC/mL, respectivamente. Isto ocorreu devido às maiores concentrações de polpa estabelecidas nesses ensaios, uma vez que, o aumento da concentração desta variável leva ao aumento da concentração de açúcares disponíveis para fermentação.

Por sua vez, nos ensaios que apresentaram a menor concentração de ácido lático (1, 5 e 7), apenas a condição 5 foi a que apresentou menor viabilidade (7,98 Log UFC/mL). Este valor ocorreu devido a menor concentração de inóculo definida no planejamento (0,09 % V/V) (Tabela 5). Nos ensaios 1 e 7, a viabilidade ficou em 8,74 e 9,16 Log UFC/mL, porém a baixa produção de lático pode ter sido devido às menores concentrações de polpa (0,5 e 2,95 % V/V), respectivamente (Tabela 5).

Figura 9 - Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, concentração de ART, pH e concentração de ácido lático após as fermentações nas condições do planejamento experimental.



O ácido lático possui atividade antimicrobiana, assim como os ácidos málico, cítrico, butírico e tartárico. A magnitude do efeito antimicrobiano varia de um ácido para o outro e é dependente da concentração e do pH (SHEEHAN et al., 2007). Com o pH baixo, a maioria dos ácidos orgânicos estará na forma não dissociada. Ácidos orgânicos não dissociados são lipofílicos e podem difundir através da membrana plasmática das células microbianas, conferindo o caráter antimicrobiano (DIBNER; PUTTIN, 2002).

Tal afirmação pode ser corroborada nos trabalhos de Marianelli, Cifani & Pasquali (2010) e Zhang et al. (2011), quando estes verificaram que *L. rhamnosus* GG só foi efetivo contra *Salmonella* quando o pH do meio de fermentação foi menor que 4,5 e a concentração do ácido lático estava acima de 1,2 g/L (MARIANELLI; CIFANI; PASQUALI, 2010). De maneira semelhante, a atividade antibacteriana contra *Shiguella* foi gradual com o tempo de fermentação e produção do ácido lático (ZHANG et al., 2011). Os resultados encontrados no DCCR (Tabela 5) podem indicar uma possível ação antibacteriana de *L. rhamnosus* ATCC 7469, uma vez que, os valores de pH para as condições de maior razão (RVpH) ficaram próximos a 4,5 e as concentrações de ácido lático acima de 4,0 g/L (Figura 9).

Um modelo quadrático foi usado para estabelecer a RVpH. A Equação 1 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 6), visto que o Teste-F calculado foi de 146,75 e o Teste-F tabelado, para 95% de confiança, foi de 6,26. Por outro

lado, a razão entre a MQ por falta de ajuste e a MQ pelo erro puro foi menor ($F_{\text{calc}} = 10$) que o Teste-F tabelado para 95% de confiança ($F_{\text{tab}} = 215,7$). 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. A equação polinomial de segunda ordem para a razão entre a viabilidade (Log UFC.mL-1) e o pH está representada pela Equação 4:

$$\hat{y}_1 = 2,03 + 0,23x_1 - 0,04x_2 - 0,12x_1^2 - 0,8x_2^2 + 0,12x_1 x_2 \quad \text{Eq. (4)}$$

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático polinomial.

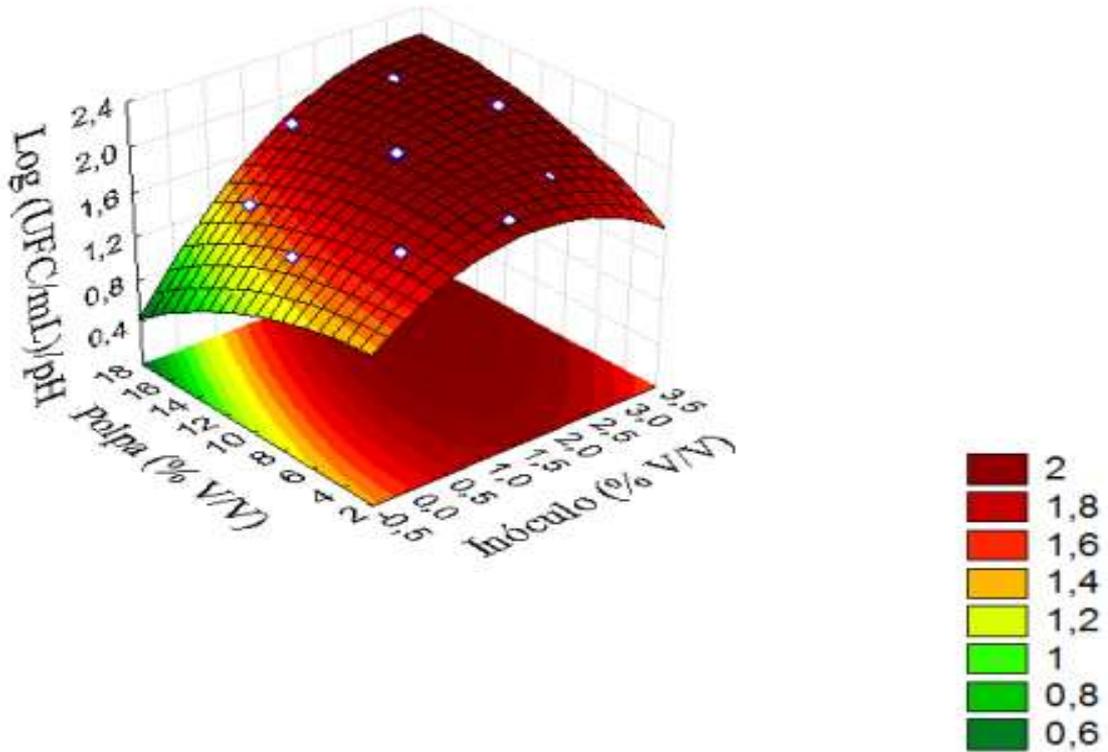
| RVpH | | | | Ácido Lático (g/L) | | | |
|-------------------------|--------|----|--------|-------------------------|---------|----|--------|
| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | Fonte de variação | SQ | GL | MQ |
| Regressão | 0,5871 | 5 | 0,1174 | Regressão | 21,1252 | 5 | 4,2250 |
| Resíduo | 0,0032 | 4 | 0,0007 | Resíduo | 0,5287 | 4 | 0,1321 |
| 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 |
| Total | 0,5903 | | | Total | 21,6539 | | |
| % de variação explicada | 0,9943 | | | % de variação explicada | 0,9749 | | |

SQ - Soma quadrática; GL - Grau de liberdade; MQ - Média quadrática.

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), é apresentada na Figura 10. Um aumento na concentração de inóculo resultou em um aumento na razão, que por sua vez, foram obtidos maiores crescimentos bacterianos e menores valores de pH, sendo encontrados também maiores valores para as concentrações de ácido lático. 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 contrapartida, esse efeito não foi significativo de acordo com o Teste-T (95% de confiança).

Figura 10 - Razão entre a viabilidade e o pH em função das concentrações da polpa do Maracujá da Caatinga e de inóculo utilizadas nas fermentações.



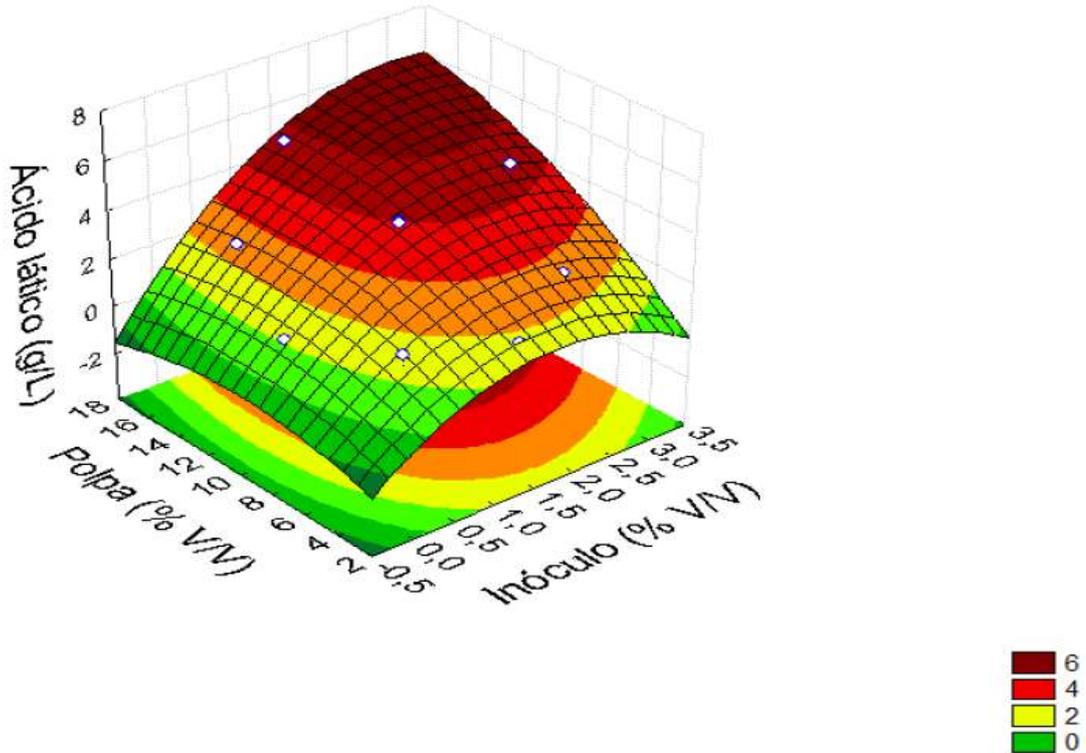
Os valores que permitiram a maior RVpH foram determinados através do gráfico de superfície de resposta pelo software Statistica. Essas concentrações foram 2,91 % V/V de inóculo e 14,45 % V/V de polpa. Para validar o modelo, uma cinética foi realizada com essas condições de cultivo.

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 6). A equação polinomial de segundo grau para a concentração de ácido lático está representada na Equação 5.

$$\hat{y}_2 = 4,01 + 1,11x_1 + 1,00x_2 - 0,59x_1^2 - 0,38x_2^2 + 0,49x_1x_2 \quad \text{Eq. (5)}$$

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 11.

Figura 11- 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 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

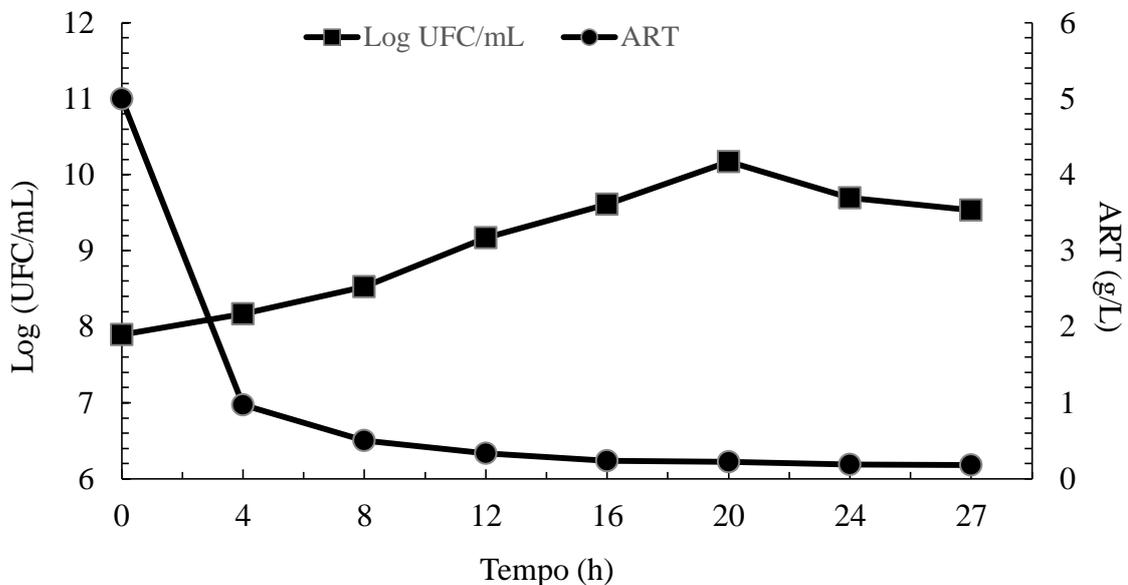


Quanto maiores foram as concentrações de polpa e de inóculo, maior foi a concentração de ácido láctico. Todos os efeitos das variáveis na concentração de ácido láctico foram significativos de acordo com o Teste-T (95% de confiança). Novamente, derivando-se o modelo quadrático em função de cada uma das 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. No entanto, essas condições não foram testadas, uma vez que o modelo para RVpH mostrou diferentes efeitos das variáveis nas respostas, ou seja, para uma alta razão, a concentração de polpa deve diminuir. Por outro lado, a concentração de polpa deve aumentar para uma alta concentração de ácido láctico.

5.3 Estudo cinético da fermentação usando as melhores condições previstas pelo DCCR

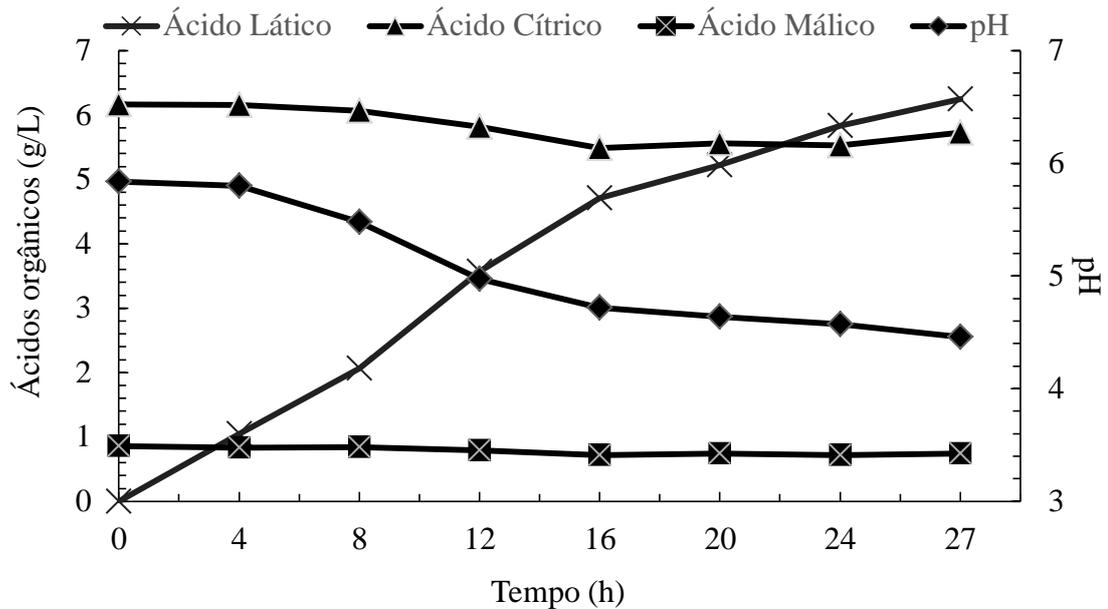
Nas melhores condições de fermentação (2,91% V/V de inóculo e 14,45% V/V de polpa), um rápido crescimento foi observado (Figura 12). Após 20h, a concentração de colônias viáveis chegou a 10 Log UFC.mL⁻¹. A velocidade específica máxima de crescimento foi $\mu_{\text{máx}}$ foi 0,25 h⁻¹. O valor máximo para RVpH foi de 2,19, obtido após 20 h de fermentação. Este valor está muito próximo daquele previsto pelo modelo matemático (2,17). Chang & Liew (2012) encontraram 10 Log (UFC/mL) após 20h de fermentação em meio à base de extrato de levedura utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Em outro estudo, Sharma & Mishra (2014) obtiveram um aumento de 5 Log para 7 Log após 24h de fermentação em suco de vegetais utilizando *L. plantarum* NCDC 414, e $\mu_{\text{máx}}$ foi 0,45 h⁻¹.

Figura 12 - Viabilidade do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 e concentração de ART durante a fermentação do Maracujá da Caatinga.



A concentração de ART foi praticamente zerada após 16 horas de cultivo (Figura 12). A máxima produção de ácido láctico foi obtida após 27 horas (Figura 13). O pH diminuiu devido a produção de ácido láctico, sendo o valor mais baixo 4,5. Os ácidos cítrico e málico se mantiveram constantes em $5,81 \pm 0,26$ g.L⁻¹ e $0,78 \pm 0,05$ g.L⁻¹, respectivamente. Durante a fermentação, a produção de ácido láctico ocorreu paralelamente ao crescimento microbiano. Uma produção significativa ocorreu tanto na fase de crescimento quanto na fase estacionária. Sendo assim, foi possível propor 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 13 - Concentração de ácidos orgânicos e pH durante o cultivo do Maracujá da Caatinga.



Estes resultados indicam que o suco do Maracujá da Caatinga se mostrou adequado para o crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469. Trabalhos anteriores verificaram que a viabilidade de *Lactobacillus* spp é influenciada por fatores como pH e composição do meio (MOUSAVI et al., 2011; CHANG; LIEW, 2012; PAKBIN et al., 2014; FILANNINO et al., 2015). Embora os sucos de fruta contenham nutrientes essenciais (minerais, vitaminas, fibras dietéticas, antioxidantes) para manutenção da viabilidade do probiótico, há fatores que podem ser limitantes à sobrevivência das linhagens, tais como: baixo pH (~ 2,5 – 3,2), alto nível de ácidos orgânicos e compostos fenólicos (PERRICONE et al., 2014).

No presente trabalho, estes fatores parecem não ter influenciado o crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469, visto que, a concentração de compostos fenólicos na polpa do Maracujá da Caatinga (3,12 mg/L) é baixa se comparada com o teor de fenólicos em frutas vermelhas, como romã (4,3 g/L) e cranberry (1,5 g/L), por exemplo (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; SANTOS et al., 2017). Como também, autores verificaram que concentrações até 15 e 3,5 g/L de ácido cítrico e málico, respectivamente, não influenciaram a viabilidade de *Lactobacillus* spp., e sim, auxiliaram na manutenção bacteriana durante estocagem em sucos de fruta (NUALKAEKUL; SALMERON; CHARALAMPOPOULOS, 2011).

5.4 Avaliação dos sucos probióticos durante armazenamento refrigerado

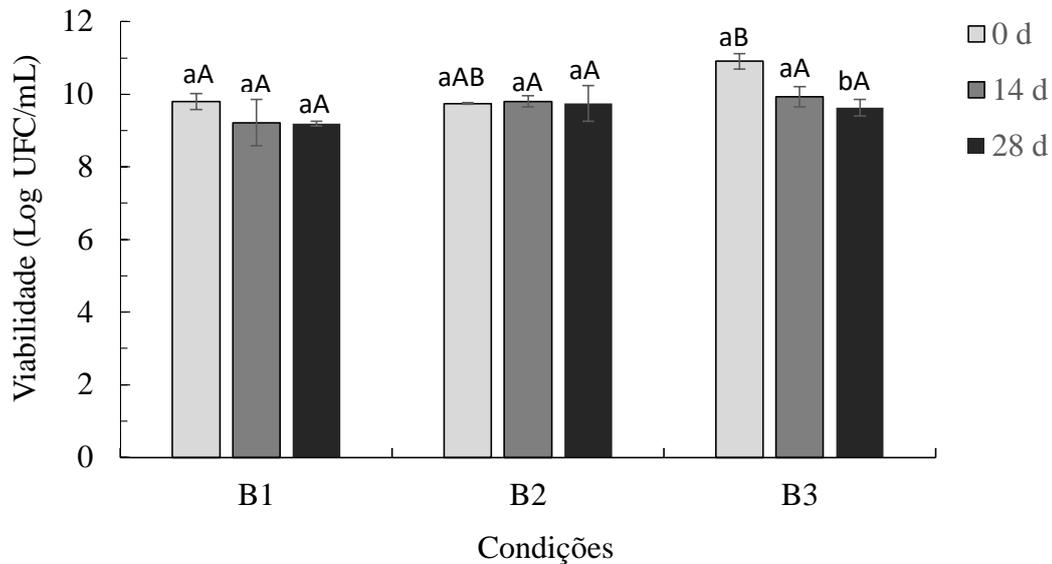
5.4.1 Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* no suco do Maracujá da Caatinga

Após o estudo cinético das melhores condições previstas pelo DCCR, o fermentado (B3), proveniente da validação do modelo (Figura 12 e 13), foi estocado a 4°C. A fermentação prévia no suco do Maracujá, cujas condições foram as do DCCR, serviu para elaboração do suco probiótico não fermentado B2. Por fim, para comparar a influência da fermentação na viabilidade de *L. rhamnosus*, o suco B1 teve o inóculo proveniente do meio MRS. Bevilacqua et al. (2013) relataram que a viabilidade celular pode ser melhorada otimizando o processo de fermentação que leva à produção de células mais robustas para ser incorporadas à matriz alimentar. A partir disso, as variações na formulação dos sucos não fermentados e fermentados serviram no intuito de aprofundar o entendimento sobre o comportamento do micro-organismo durante o armazenamento refrigerado (4°C).

Na Figura 14, é possível verificar a diminuição na viabilidade de B1 (0,6 Log) e B3 (1,3 Log) ao final do período de armazenamento. A viabilidade de B2 permaneceu constante durante os 28 dias, não havendo diferença significativa nesse período. A viabilidade inicial em B3 diferiu significativamente de B1. Embora B3 tenha iniciado o armazenamento com a concentração celular 10 % maior que os outros sucos, com 28 dias a viabilidade foi similar àquelas encontradas para os outros sucos.

As viabilidades ficaram entre 9 e 10 Log UFC/mL para os 3 sucos probióticos, durante o armazenamento refrigerado. De acordo com a FAO/WHO (2001), a concentração mínima de probióticos presente na dosagem diária do produto deve ser de 6 Log UFC/mL. Assim, a etapa de fermentação no suco B2 não influenciou na viabilidade das células probióticas, sendo considerada desnecessária para os experimentos seguintes de encapsulação.

Figura 14 - Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 nos sucos do Maracujá da Caatinga (B1, B2 e B3), durante armazenamento refrigerado. Diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($P \leq 0.05$) durante o tempo na mesma condição de armazenamento; diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ($P \leq 0.05$) entre as condições de armazenamento durante o tempo.



5.4.2 Concentração de carboidratos, ácido lático e pH dos sucos probióticos durante o armazenamento refrigerado

A Tabela 7 apresenta as concentrações dos açúcares redutores totais (ART) inicial e final dos três sucos probióticos no armazenamento. Há um aumento na concentração de ART nas condições B1 e B2. Por outro lado, houve diminuição do ART na condição B3. O aumento na concentração de ART pode estar associado a alta taxa de hidrólise da sacarose quando comparado com o consumo da glicose no meio (COSTA et al., 2013).

O ácido lático, produto do metabolismo de *Lactobacillus* (FONTELES et al., 2011; DIBNER; BUTTIN 2002), foi produzido em concentrações diferentes de acordo com cada condição (Tabela 7). Maior produção foi obtida na condição B2, seguida da condição B1 e B3. Apesar da diferença na concentração de ácido lático entre as condições B1 e B2 ser baixa (0,6 g/L), a etapa prévia de fermentação do Maracujá da Caatinga, realizada na condição B2, ainda se mostra desnecessária à elaboração de uma bebida probiótica. O pH dos sucos probióticos diminuiu durante a estocagem. A maior redução foi em B2 (12 %), seguido de B3 (11 %) e B1 (9 %). Estas reduções foram devido à produção do ácido lático.

Tabela 7 - Concentração de açúcares redutores totais (ART), ácido láctico e pH dos sucos fermentado (B3) e não fermentados (B1 e B2).

| Sucos | ART (g/L) ±DP | | Ácido Láctico (g/L)±DP | | pH±DP | |
|-------|---------------|-------------|------------------------|-----------|-------------|-----------|
| | Tempo (dia) | | Tempo (dia) | | Tempo (dia) | |
| | 0 | 28 | 0 | 28 | 0 | 28 |
| B1 | 94,9 ± 1,7 | 106,2 ± 0,6 | 0,0 ± 0,0 | 2,8 ± 0,1 | 4,5 ± 0,0 | 4,1 ± 0,1 |
| B2 | 99,4 ± 0,6 | 105,6 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 3,6 ± 0,0 | 4,5 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 |
| B3 | 133,7 ± 10,1 | 125,3 ± 0,6 | 5,4 ± 1,4 | 6,8 ± 0,1 | 4,8 ± 0,1 | 4,2 ± 0,0 |

B1 - pH 4,5 e inóculo proveniente do meio MRS; B2 - pH 4,5 e inóculo proveniente do suco de Maracujá da Caatinga fermentado; B3 - fermentado; DP – desvio padrão (n=2).

Trabalhos relatam produção de ácido láctico por micro-organismos probióticos, sob condições refrigeradas, em sucos de fruta. Nualakekul & Charalampopoulos (2011), por exemplo, obtiveram diferentes concentrações de ácido láctico no armazenamento de *L. plantarum* NCIMB 8826 em sete sucos de fruta comerciais não fermentados: laranja (2,7 g/L), uva (1,9 g/L), groselha (1,4 g/L), abacaxi (2,0 g/L), romã (0,1 g/L), cranberry (0 g/L) e limão (1,3 g/L), depois de seis semanas à 4°C. Enquanto que, em outro estudo, os mesmo autores verificaram produção de ácido láctico por *B. longum* NCIMB 8809 no sucos de laranja (0,5 g/L), uva (0,8 g/L), groselha (0,7 g/L) e abacaxi (0,5 g/L), armazenados a 4°C por 6 semanas (NUALAKEKUL & CHARALAMPOPOULOS et al., 2011). É possível verificar nos trabalhos citados que os tipos de suco influenciam diferentemente na produção do ácido láctico, pois possuem composição nutricional variada, influenciado no metabolismo do micro-organismo.

5.5 Experimentos preliminares para a encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

Com o intuito de prolongar a viabilidade do probiótico no suco do Maracujá da Caatinga, o método de encapsulação foi proposto. Nos experimentos preliminares foi possível verificar que a menor e a maior concentração de pectina (0,5 e 5 % m/V) não foram vantajosas, visto que ou não formaram ou não desintegraram as cápsulas, respectivamente. Dessa forma, as condições que melhor levaram a formação e desintegração das cápsulas de pectina foram 1, 2, 3 e 4 % (m/V).

Na Tabela 8 é possível verificar que houve um pequeno aumento na eficiência da encapsulação com o aumento da concentração de pectina. A redução da viabilidade foi

semelhante entre todas as condições, havendo decaimento de aproximadamente 1 log entre a viabilidade inicial e final. Os ensaios 2 e 4 não são significativamente diferentes, assim como 3 e 4, no nível de 95 % de confiança.

Tabela 8 - Viabilidade do probiótico e eficiência da encapsulação após técnica de extrusão.

| Pectina (% m/V) | Viabilidade Inicial (Log UFC/mL) | Viabilidade Final (Log UFC/mL) | Eficiência (%) |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 1 | 9,46 ± 0,03 | 8,05 ± 0,04 | 85,0 ± 0,20 |
| 2 | 9,46 ± 0,03 | 8,46 ± 0,02 | 89,4 ± 0,03 |
| 3 | 9,46 ± 0,03 | 8,31 ± 0,01 | 87,8 ± 0,11 |
| 4 | 9,46 ± 0,03 | 8,39 ± 0,02 | 88,7 ± 0,25 |

Sandoval-Castilla et al. (2010) verificaram que ao aumentar a concentração do agente encapsulante, maior era a eficiência da encapsulação. Isto acontece devido a maior reticulação da molécula de pectina (FRAEYE et al., 2010; BRINQUES et al., 201). Por sua vez, a alta eficiência da encapsulação pode ser devido à resistência natural do micro-organismo e as condições brandas de encapsulação, tais como: temperatura ambiente (25°C) e pH 7,1.

A comparação entre os processos de encapsulação torna-se complicada, visto que parâmetros como diversidade de micro-organismos e tipo de material utilizado são variados para se obter uma boa eficiência de encapsulação. Gebara et al. (2013), Eckert et al. (2018) e Vaziri et al. (2018) encontraram eficiências acima de 84 % encapsulando *Lactobacillus* spp. pelo método de extrusão e usando uma concentração de 2 % m/V de pectina juntamente com outros materiais de revestimento, como alginato, gelatina e soro de leite, respectivamente. Em comparação com o presente trabalho, foi possível obter eficiências maiores que 85 % sem a necessidade de adicionar outros polímeros. Isso provavelmente se deve ao maior percentual de pectina utilizada.

5.6 Aplicação do Planejamento Composto Central Rotacional para otimização da encapsulação

Um Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para investigar a eficiência da encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Os ensaios foram realizados como apresentado na Tabela 9. Como ponto central foi escolhido 4 % (m/V) de pectina, uma vez que esta concentração foi utilizada na formulação de cápsulas com alta

eficiência (90 %) de encapsulação de probióticos (BRINQUES et al. 2011; NUALKAEKUL et al., 2013). Com base no trabalho de Nualkaekul et al. (2013), a concentração de 0,15 M de CaCl_2 foi usada como ponto central.

Analisando a parte fatorial do planejamento (ensaios 1, 2, 3 e 4), verifica-se que quando há variação da concentração do cloreto (0,10 para 0,20 mol/L) e a concentração de pectina é 3,5 % m/V (ensaios 1 e 2), não ocorre variação na eficiência de encapsulação. Entretanto, com o aumento da concentração de pectina para 4,5 % m/V e variação na concentração do cloreto foi observado redução na eficiência (ensaios 3 e 4). De maneira geral, observa-se que o aumento da concentração de pectina (3,5 para 4,5 % m/V) ocasiona a redução na eficiência da encapsulação, independente da concentração de cloreto de cálcio (ensaios 1, 2, 3 e 4). Na parte axial do planejamento a eficiência diminui quando a pectina aumenta de 3,2 para 4,7 % m/V (ensaios 5 e 6). Por outro lado, a eficiência aumenta quando o cloreto aumenta de 0,08 para 0,22 mol/L (ensaios 7 e 8). A maior eficiência foi encontrada no ponto central (ensaios 9 e 10), com pectina 4 % m/V e cloreto de cálcio 0,15 mol/L.

Tabela 9 - Condições do planejamento experimental e as respostas da eficiência da encapsulação.

| Ensaios | Pectina (% m/V) | CaCl_2 (Mol) | EE (%) |
|---------|--------------------|-----------------------|--------------|
| 1 | 3,5 | 0,10 | 81,29 ± 0,34 |
| 2 | 3,5 | 0,20 | 81,28 ± 0,73 |
| 3 | 4,5 | 0,10 | 77,07 ± 0,41 |
| 4 | 4,5 | 0,20 | 75,09 ± 0,16 |
| 5 | 3,2 | 0,15 | 86,74 ± 0,63 |
| 6 | 4,7 | 0,15 | 80,90 ± 0,48 |
| 7 | 4,0 | 0,08 | 75,75 ± 0,05 |
| 8 | 4,0 | 0,22 | 81,74 ± 3,30 |
| 9 | 4,0 | 0,15 | 92,03 ± 2,38 |
| 10 | 4,0 | 0,15 | 94,26 ± 0,13 |

A partir desta análise, ambas as variáveis influenciam de forma negativa na encapsulação, isto é, o aumento tanto da concentração de pectina, quanto da concentração do cloreto de cálcio, diminuem a eficiência da encapsulação. Mierczynska et al. (2015) relatam que quanto maior a concentração de Ca^{2+} , maior a viscoelasticidade dos géis de pectina e, por sua vez, géis mais firmes são formados. Da mesma forma, quantidades elevadas de pectina podem formar géis extremamente rígidos, reduzindo a flexibilidade das cadeias de pectina e

limitado a entrada dos micro-organismos à estrutura polimérica (FRAEYE et al., 2010). Esta hipótese foi confirmada pelo modelo quadrático polinomial (Equação 6), em que os coeficientes são negativos.

$$\hat{y}_1 = 93,14 - 5,31x_1^2 - 7,85x_2^2 \quad \text{Eq. (6)}$$

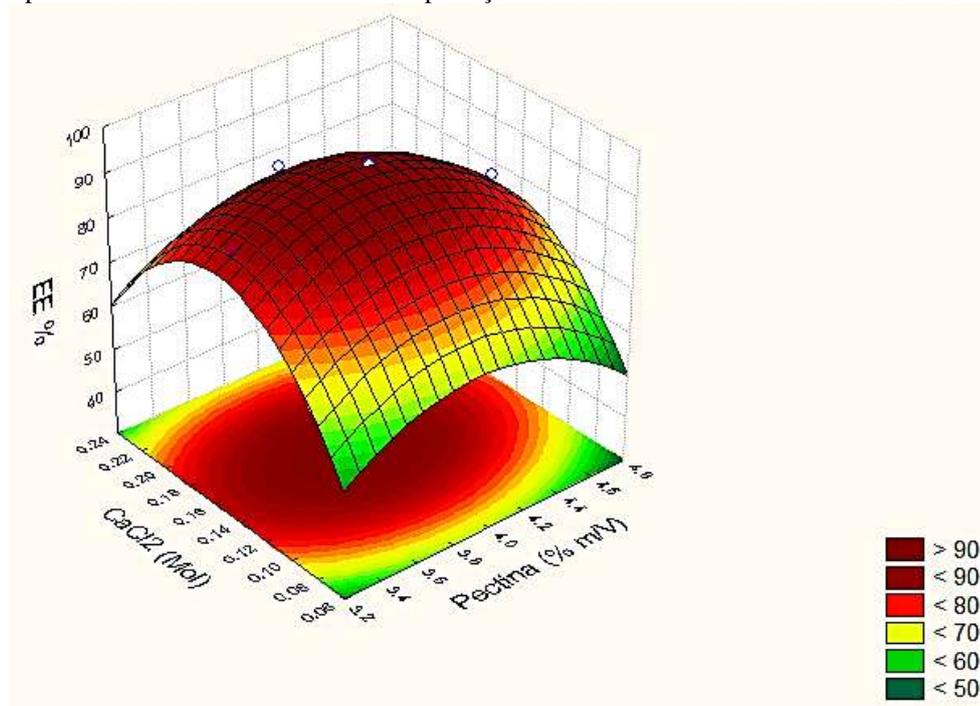
O nível de significância estatística do modelo foi avaliado pelo Teste-F. A razão entre a média quadrática devido à regressão (MQ_R) e a média quadrática residual (MQ_r), isto é, o Teste-F calculado (F_{calc}) foi 17,23, indicando que foi estatisticamente significativa quando comparado com o Teste-F tabelado ($F_{\text{tab}} = 5,05$) para 95% de confiança. Por outro lado, a razão entre a média quadrática por falta de ajuste (MQ_{faj}) e a média quadrática devido ao erro puro (MQ_{ep}) foi 2,88 (F_{calc}), não sendo significativo, uma vez que foi menor que o F_{tab} (224,6) para 95% de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,9323. A Tabela 10 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o segundo modelo quadrático polinomial.

| Fonte de variação | Soma Quadrática | N ^o de graus de liberdade | Média Quadrática |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------------|------------------|
| Regressão | 430,76 | 4 | 107,69 |
| Resíduos | 31,24 | 5 | 6,25 |
| Falta ajuste | 28,75 | 4 | 7,19 |
| Erro puro | 2,50 | 1 | 2,50 |
| Total | 462,00 | | |
| % de variação explicada | 0,9324 | | |

A superfície de resposta que representa a eficiência da encapsulação em função das variáveis independentes (concentração de pectina e de cloreto de cálcio) é apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Superfície de resposta obtida para a eficiência da encapsulação em função das concentrações de pectina e de CaCl_2 utilizadas na encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.



As concentrações das variáveis investigadas que permitiram a obtenção da maior eficiência da encapsulação (EE %) foram determinadas através do software Statistica. Essas concentrações foram 3,88 % m/V de pectina e 0,15 M de CaCl_2 . Para validar o modelo, foram preparadas cápsulas de pectina com a condição estimada pelo modelo estatístico. A eficiência foi 90,2 %, valor próximo àquele predito pelo modelo (93,4 %). Brinques et al. (2011) e Dafe et al (2017) reportaram que o rendimento da encapsulação aumenta com a adição de revestimento às cápsulas, de modo que a eficiência foi quase 95 % quando as cápsulas foram revestidas com quitosana ou amido. No presente trabalho, eficiências similares foram obtidas sem o revestimento das cápsulas de pectina.

5.7 Eficiência da liofilização

Para melhorar a estabilidade a longo prazo dos probióticos, a liofilização tem sido empregada para reduzir o teor de água em produtos funcionais (BROECKY et al., 2016), diminuindo a atividade microbiológica (ALBADRAN et al., 2015). Dessa maneira, a proteção exercida pela encapsulação de probióticos e secagem em liofilizador em conjunto são alternativas viáveis para manutenção por longos períodos e uso em qualquer veículo alimentar (MARTÍN et al., 2015).

As cápsulas obtidas por extrusão, nas melhores condições do DCCR (3,8 % m/V de pectina e 0,15 M de CaCl₂), foram secas por liofilização, com e sem a adição de sacarose, bem como do suco do Maracujá da Caatinga (Tabela 11). Todos os desvios padrão relativos foram menores que 0,38 %.

Tabela 11 - Eficiência da liofilização das cápsulas obtidas pelo método de extrusão.

| Tratamento | Sacarose (%) | Polpa (%) | EL (%) |
|------------|--------------|-----------|--------|
| L1 | - | - | 83,36 |
| L2 | 10 | 20 | 70,36 |
| L3 | 10 | | 87,51 |
| L4 | 10 | | 70,45 |

L1 –cápsulas liofilizadas sem suco e sem crioprotetor; L2 – cápsulas ressuspensas no suco do Maracujá da Caatinga antes da liofilização; L3 – cápsulas ressuspensas em solução de sacarose antes da liofilização; L4 – cápsulas liofilizadas contendo sacarose dentro da matriz polimérica.

As quatro condições de liofilização permitiram eficiências maiores que 70%. A maior eficiência foi obtida para a condição L3, isto é, quando as cápsulas foram adicionadas à solução de sacarose antes da liofilização. As cápsulas liofilizadas sem adição de sacarose ou polpa (L1) apresentou eficiência 13 % maior que as cápsulas adicionadas ao suco (20 % V/V polpa) com sacarose (10 % V/V) antes da liofilização (L2). A condição L4, isto é, quando a sacarose foi adicionada à solução polimérica, isso se dá na etapa de extrusão, apresentou eficiência de encapsulação similar àquela observada na condição L2. A presença da polpa (L2) ou da sacarose (L4) quando adicionada à solução polimérica diminuíram a eficiência da encapsulação, mas ainda manteve-se acima de 70 %. Não houve diferença significativa entre as eficiências obtidas nas condições de liofilização L2 e L4 no nível de 95 % de confiança ($F = 549,4$; $p = 0,004547$). A diferença entre as condições de liofilização L3 e L4 foi o momento de adição da sacarose. Esta diferença repercutiu numa eficiência 17,14 % maior na condição L3.

Trabalhos similares apresentaram eficiências de liofilização próximas às encontradas neste trabalho utilizando outros agentes encapsulantes. Xu et al. (2016), por exemplo, encapsularam *L. casei* com alginato e proteína isolada de ervilha por extrusão, e obtiveram eficiência de 86 % após liofilização das cápsulas sem crioprotetor. Este valor foi um pouco maior (3 %) que a condição controle L1, apresentada no presente trabalho, utilizando apenas pectina como agente encapsulante.

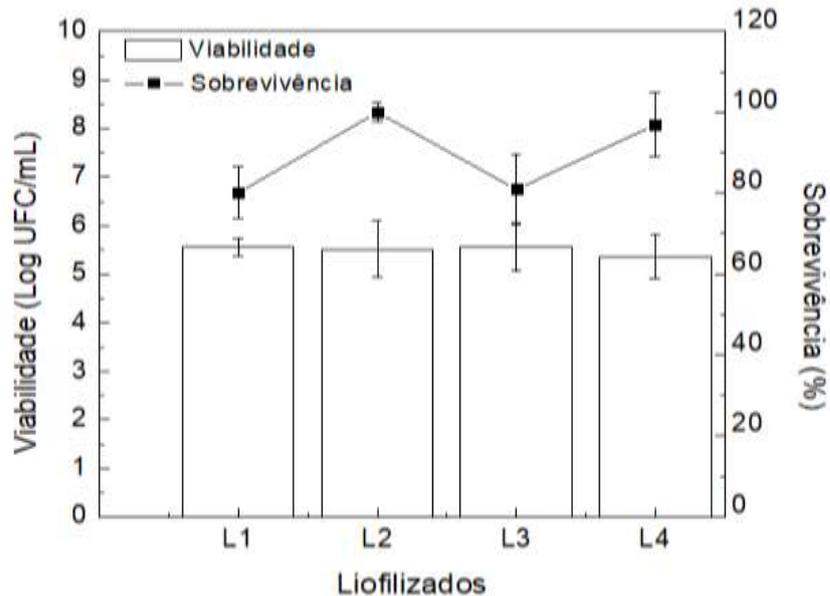
Quando aplicada a técnica extrusão e posterior liofilização para encapsular *L. reuteri* CRL 1324 usando gelatina e xantana, as eficiências da liofilização foram cerca de 70 e 62 % para as cápsulas com e sem crioprotetor (Leite desnatado 16 % m/V), respectivamente (TOMÁS et al., 2015). Por sua vez, Halim et al. (2017) também utilizaram leite desnatado (10 % m/V) como crioprotetor para liofilizar cápsulas de alginato contendo *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, produzidas pela técnica de extrusão. Os autores verificaram eficiências de 92 e 60 % para as cápsulas com e sem crioprotetor após o processo de liofilização. Nestes trabalhos, as cápsulas foram ressuspensas na solução de leite desnatado e posterior liofilizadas. O mesmo mecanismo foi aplicado na condição L3, porém em solução de sacarose, e resultados semelhantes foram encontrados, ou seja, cápsulas contendo crioprotetor apresentando eficiência maior que cápsulas sem crioprotetor.

Contrariando esse padrão, as cápsulas da condição L4 também tinham crioprotetor na formulação mas dentro da matriz polimérica (pectina), e apresentaram eficiência menor que o controle (L1). Esse resultado vai de encontro ao trabalho de Li et al. (2016), em que o crioprotetor (glicose 10 % m/V) foi adicionado à matriz de pectina, na etapa de extrusão, e os autores verificaram sobrevivência de *L. rhamnosus* GG de 85 e 75 % nas cápsulas com e sem crioprotetor, após a liofilização. Huabálek (2003) cita que açúcares usados como agentes criopreservativos mostram diferentes efeitos protetivos em variadas espécies de bactérias (HUABÁLEK, 2003). Mais uma vez, parâmetros como matriz polimérica, tipo de micro-organismo e condições de liofilização são fatores que influenciam na resposta final.

As cápsulas liofilizadas foram mantidas em temperatura ambiente e a viabilidade foi determinada no início e após 30 e 60 dias de armazenamento. A ideia deste estudo foi analisar a sobrevivência de *L. rhamnosus* nas cápsulas liofilizadas para que estas pudessem, posteriormente, ser incorporadas em algum veículo alimentar, com exceção das cápsulas obtidas na condição L2. O material obtido nesta condição se tratava de um produto pronto para consumo após ressuspensão em água, uma vez que as cápsulas foram adicionadas ao suco contendo sacarose antes da liofilização.

Na Figura 16 são apresentadas as viabilidades e as sobrevivências do *L. rhamnosus* ATCC 7469 nas cápsulas liofilizadas e armazenadas em temperatura ambiente, após 30 dias. Não houve diferença significativa com relação à viabilidade ou à sobrevivência no nível de 95 % de confiança. Com 60 dias, as células não estavam viáveis em nenhuma das quatro tipos de cápsulas liofilizadas.

Figura 16 – Viabilidade e sobrevivência após 30 dias de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 nas cápsulas liofilizadas e armazenadas em temperatura ambiente. L1 –cápsulas liofilizadas sem suco e sem crioprotetor; L2 – cápsulas ressuspensas no suco do Maracujá da Caatinga (20 % m/V de polpa e 10 % m/V de sacarose) antes da liofilização; L3 – cápsulas ressuspensas em solução de sacarose (10 % m/V) antes da liofilização; L4 – cápsulas liofilizadas contendo sacarose dentro da matriz polimérica.



Na presença da polpa e da sacarose ou apenas da sacarose na obtenção das cápsulas, condições L2 e L4, respectivamente, as sobrevivências foram maiores do que nas condições L1 (sem polpa e sem sacarose) e L3 (sem polpa e com sacarose). Isto foi interessante, pois é o contrário do que aconteceu com a eficiência da liofilização. Este fato é um indicativo de que não podemos avaliar a eficiência da encapsulação independente da sobrevivência nas cápsulas liofilizadas durante o armazenamento.

Tem sido relatado na literatura que a sobrevivência dos probióticos em formulações secas pode ser influenciada pela temperatura de armazenamento (ALBADRAN et al., 2015). Esta afirmação pode ser corroborada por Tomás et al. (2015), que verificaram sobrevivência acima de 60 % quando encapsularam *L. reuteri* CRL 1324 por extrusão seguido de liofilização (com e sem crioprotetor), após 120 dias de armazenamento refrigerado. Porém, quando armazenadas em temperatura ambiente, as células não estavam mais viáveis em 60 dias. Etchepare et al. (2016) observaram padrão diferente quando liofilizaram cápsulas contendo *L. acidophilus*, encapsulado por extrusão, e relataram sobrevivência acima de 80 % nas cápsulas liofilizadas armazenadas seja em temperatura ambiente ou a 4°C, por 60 dias.

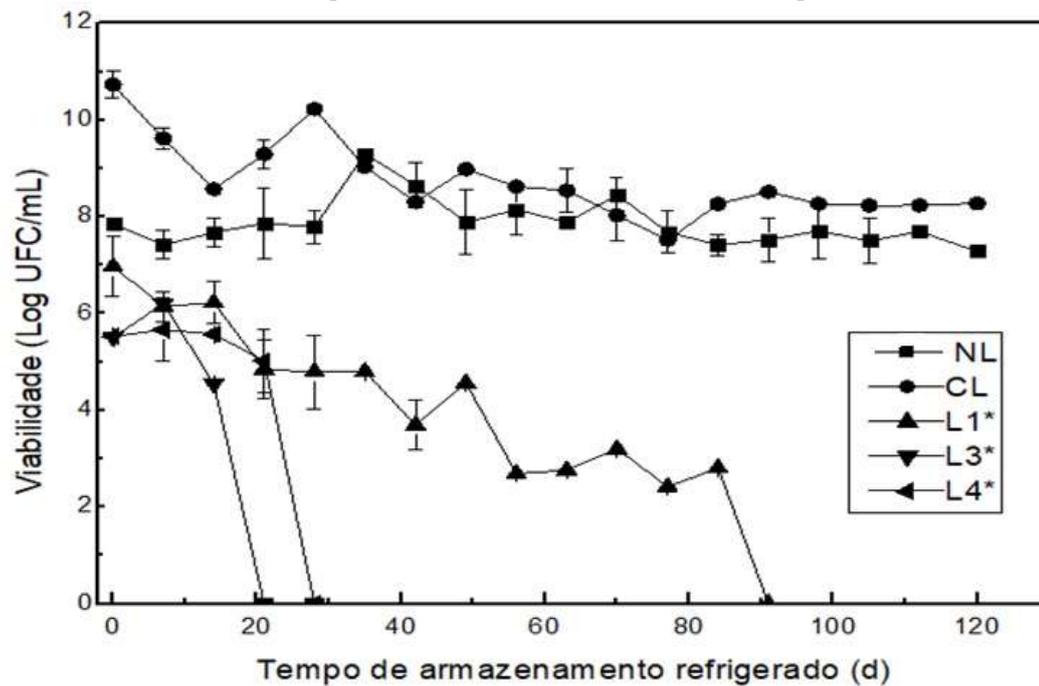
5.8 Influência das condições das células na manutenção de sucos probióticos durante armazenamento refrigerado

As cápsulas liofilizadas nas condições L1, L3 e L4 foram adicionadas ao suco do Maracujá da Caatinga (polpa 20 %) contendo sacarose (10 %) e a viabilidade celular foi determinada durante 120 dias de armazenamento refrigerado (4°C), para avaliação das condições das células na manutenção de sucos probióticos.

O suco L1* (células liofilizadas sem polpa e sem sacarose) apresentou a maior viabilidade, em comparação com os outros dois sucos contendo as cápsulas liofilizadas nas condições L3 e L4. As células obtidas na condição L1 permaneceram viáveis até quase 100 dias de armazenamento refrigerado em suco do Maracujá da Caatinga. Entretanto, as células obtidas nas condições L3 e L4 permaneceram viáveis por apenas 30 dias (sucos L3* e L4*). Resultado semelhante àquele observado quando as cápsulas liofilizadas foram mantidas secas e sem refrigeração. Logo, a presença do suco favoreceu apenas a manutenção das células viáveis, durante um período maior do que 30 dias, nas cápsulas obtidas na condição L1. A diferença das cápsulas L1 em relação às cápsulas L3 e L4 foi a presença de sacarose, cuja adição foi realizada após a obtenção das cápsulas por extrusão (L3) ou durante a obtenção das mesmas, isto é, na solução de pectina (L4).

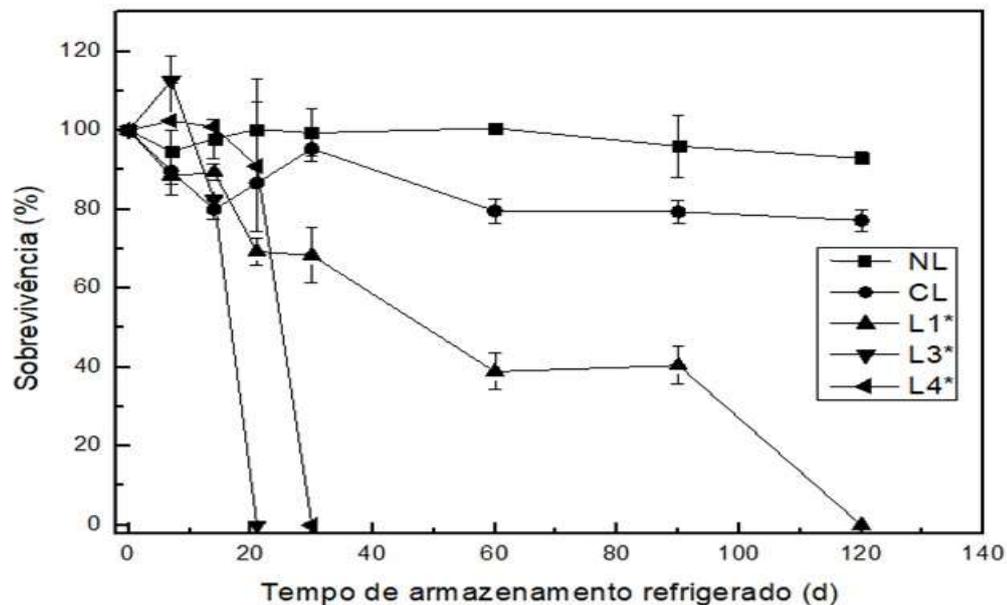
Por outro lado, a viabilidade nas cápsulas não liofilizadas (NL) permaneceu praticamente constante durante todo o período de armazenamento (120 dias), finalizando em 7,28 Log UFC/mL. As células livres (CL) sofreram uma redução de 2,47 Log na primeira quinzena do armazenamento, e após este período se mantiveram com a viabilidade constante e acima de 8,2 Log UFC/mL. Na Figura 17 é apresentada a viabilidade das células nas cápsulas com e sem liofilização.

Figura 17 - Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 livre e encapsulado, mantidos no suco do Maracujá da Caatinga, durante armazenamento refrigerado. NL – cápsulas não liofilizadas; CL – células livres; L1*, L3* e L4* - cápsulas L1, L3 e L4 adicionadas ao suco, respectivamente.



A sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 livre e encapsulado, no suco do Maracujá da Caatinga, é apresentada na Figura 18. Na condição L1* a sobrevivência celular foi de 40 % em 90 dias de armazenamento refrigerado. Para os sucos contendo as cápsulas liofilizadas L3* e L4*, as células não estavam mais viáveis com 30 dias. A sobrevivência do probiótico foi 92,9 % e 76,7 % para as cápsulas não liofilizadas e células livres em 120 dias, respectivamente (Figura 18). Houve um aumento de quase 20 % na sobrevivência das células encapsuladas sem liofilização (NL) em relação às livres (CL).

Figura 18 - Sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 livre e encapsulado, mantidos no suco do Maracujá da Caatinga, durante armazenamento refrigerado. NL - cápsulas não liofilizadas; CL - células livres; L1*, L3* e L4* - cápsulas L1, L2 e L3 adicionadas ao suco, respectivamente.



É importante ressaltar que o armazenamento das cápsulas liofilizadas no suco do Maracujá da Caatinga não proporcionou o aumento da sobrevivência celular, independente das condições de liofilização. Por outro lado, as viabilidades ficaram acima de 5 Log UFC/mL (sobrevivências maiores que 70 %) durante 30 dias de armazenamento das cápsulas liofilizadas mantidas em temperatura ambiente (L1, L2, L3 e L4). Isto é um resultado importante, pois nesse período as cápsulas liofilizadas podem ser adicionadas a algum veículo alimentar. Entretanto, para confirmar esta hipótese, as cápsulas liofilizadas deverão ser adicionadas ao suco do Maracujá da Caatinga com até 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente, para posterior avaliação da viabilidade celular durante o armazenamento das cápsulas no suco em ambiente refrigerado.

Shoji et al. (2013) avaliaram a sobrevivência, em iogurte, de *L. acidophilus* encapsulado por coacervação utilizando pectina e caseína, com posterior liofilização (sem crioprotetor). Os autores relataram uma sobrevivência de 84 % em 28 dias de armazenamento refrigerado. Ribeiro et al. (2014) analisaram a sobrevivência de *L. acidophilus* livre e encapsulado (com e sem liofilização), no iogurte, durante 35 dias. As células probióticas foram encapsuladas pela técnica de extrusão, usando pectina e soro de leite como revestimento e posteriormente liofilizadas sem crioprotetor. Esta condição foi similar a L1* mas sem o revestimento das cápsulas. Os autores relataram sobrevivências de 89, 97 e 97 %

para as células livres e encapsuladas com e sem liofilização, respectivamente. Não houve, portanto, diferença entre as sobrevivências nas cápsulas, independente da liofilização.

Moumita et al. (2017) analisaram a viabilidade de *L. plantarum*, *L. bulgaricos* e encapsulados por extrusão, utilizando alginato e liofilização com posterior adição em dois produtos secos, sendo um à base de cereais e o outro, um achocolatado. *L. plantarum* e *L. bulgaricos* permaneceram viáveis apenas por 15 dias, tanto no cereal quanto no achocolatado em pó, apresentando sobrevivências abaixo de 40 % nesse período. No presente trabalho, a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 na condição L1* foi 69,5 % por 30 dias e cerca de 40 % com quase 100 dias, usando apenas pectin como material encapsulante e sem revestimento, mas com liofilização.

Nualkaekul et al. (2013) produziram cápsulas de pectina (4 % m/V) pelo método de extrusão, contendo *L. plantarum*, e relataram sobrevivência 60 e 90 % para as células livres e encapsuladas, no suco de romã, por 30 dias. Gandomi et al. (2016) encapsularam *L. rhamnosus* GG com alginato e quitosana, e apresentaram sobrevivência de 15 e 85 % para as células livres e encapsuladas, no suco de maçã, em 90 dias. No presente trabalho, a sobrevivência para *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi maior nas cápsulas não liofilizadas (99 %) seguido das células livres (84 %) e, por fim, nas cápsulas liofilizadas (40 %) com quase 100 dias de armazenamento refrigerado.

O perfil de acidificação nos sucos probióticos com células livres (CL) e encapsuladas sem (NL) e com liofilização (L1*, L3* e L4*) foi acompanhado durante o armazenamento refrigerado (Tabela 12). A menor redução do pH foi observada nas condições L3* e L4*, que também apresentou menor produtividade de ácido láctico. Alta produtividade foi obtida para o suco contendo células livres. Contudo, não houve diferença significativa entre as cápsulas não liofilizadas (NL) e liofilizadas (L1*).

Tabela 12 - Produtividade e diminuição do pH durante o armazenamento refrigerado dos sucos contendo células livres, encapsuladas com e sem liofilização.

| Suco | Produtividade de (mg/L.d) | Diminuição do pH (%) |
|------|------------------------------|-------------------------|
| CL | 10,2 | 10,0 |
| NL | 6,2 | 7,4 |
| L1* | 6,4 | 4,2 |
| L3* | 2,1 | 1,0 |
| L4* | 2,4 | 1,0 |

A redução do pH nas bebidas está relacionada com a produção de ácido lático pelas células probióticas, demonstrando que mesmo as células estando encapsuladas, pode ocorrer troca de metabólitos pela matriz polimérica. Isso acontece devido a matriz de pectina ser porosa e permeável. O ácido lático é considerado um antibiótico natural, cuja produção durante o armazenamento refrigerado no suco de maracujá provavelmente facilitaria o controle da microbiota. No entanto, o produto variaria durante o armazenamento, diminuindo assim sua estabilidade; mas como as produtividades volumétricas são muito baixas, as variações nos sucos foram mínimas. Pode-se considerar que os sucos mantiveram-se estáveis em relação à concentração de ácido lático.

5.9 Caracterização das cápsulas

As cápsulas com e sem liofilização foram caracterizadas quanto à umidade, tamanho e morfologia. As cápsulas não liofilizadas apresentaram formato esférico, de coloração opaca e diâmetro de 2,72 a 3,02 mm (Figura 19a). Um corte transversal na cápsula e um aumento de 1000x mostrou a integridade das células de *L. rhamnosus* aprisionadas dentro da pectina (Figura 19b). As células do probiótico se mostraram de forma bacilar e com formação de cadeias enfileiradas. As cápsulas liofilizadas formaram aglomerados após o processo de secagem, tornando difícil a medição do tamanho. Quanto à morfologia, as cápsulas liofilizadas apresentaram aspecto poroso e sem formato definido (Figura 19c).

Na microscopia eletrônica (Figura 20) foram observadas cápsulas secas de formatos irregulares, presença de multi-cavidades e superfície enrugada. Não ocorreu variação morfológica entre as quatro condições de cápsulas liofilizadas. Morfologias semelhantes para cápsulas liofilizadas podem ser visualizadas nos trabalhos de Souza et al. (2012), Tomás et al. (2015), Li et al. (2016), Etchepare et al. (2016) e Silva et al. (2018).

Figura 19 - Imagem fotográfica da cápsula de pectina: (a) Observação direta; (b) corte transversal (aumento 1000x) e (c) liofilizadas.

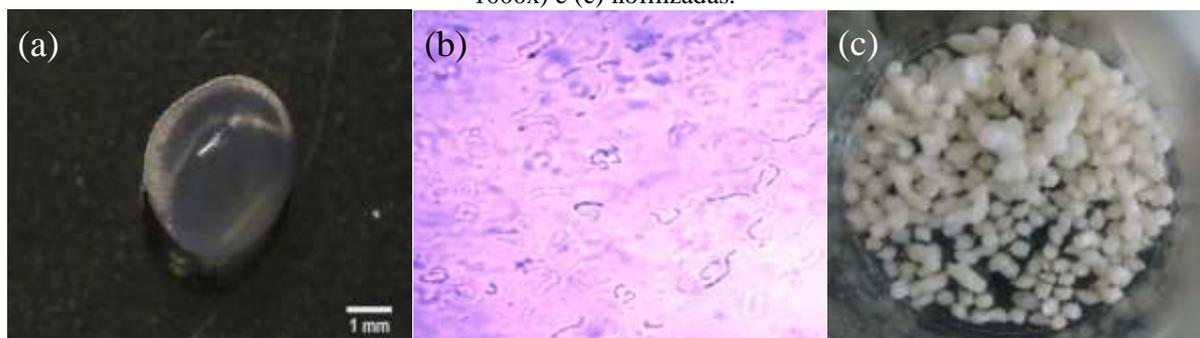
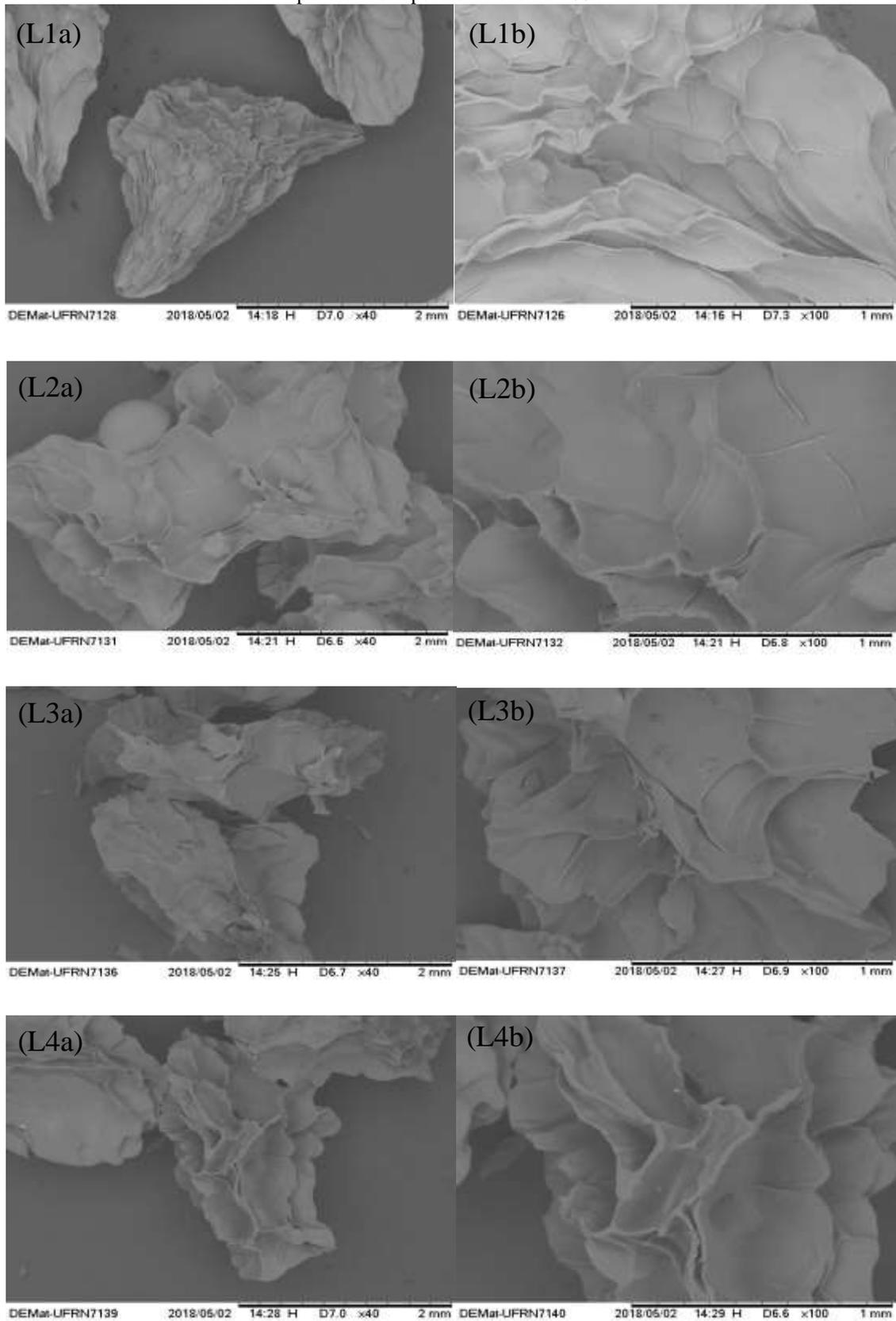


Figura 20 - Imagens de MEV das cápsulas liofilizadas. (a) Cápsula inteira. Aumento de 40x. (b) Secção da parede das cápsulas. Aumento 100x.



Segundo Cook et al. (2011) a forma irregular de cápsulas secas são concebidas ainda no processo de geleificação. Regiões de maior e menor concentração do polímero são difundidas irregularmente formando camadas nas cápsulas secas. A umidade das cápsulas não liofilizadas foi de $97,1 \% \pm 0,70$. Cápsulas formadas por processos que não usam secagem apresentam teor aquoso elevado, pois os polissacarídeos usados como agente encapsulantes possuem características hidrofílicas, retendo muita água. Ribeiro et al. (2014) e Souza et al. (2012) também obtiveram elevado teor de umidade ($96,9 \pm 0,7$ e $96,3 \pm 0,5$ %, respectivamente) quando formaram cápsulas de pectina pelo método de extrusão e coacervação, respectivamente. Em se tratando das cápsulas liofilizadas, o valor da umidade foi de $6,38\% \pm 0,46$, $8,38\% \pm 0,62$, $8,46\% \pm 0,54$, $8,65\% \pm 0,35$, para L1, L2, L3 e L4, respectivamente. Os valores de umidade encontrados neste trabalho para os quatro liofilizados estão dentro do limite definido por Albadran et al. (2015) para cápsulas contendo células probióticas liofilizadas, que é abaixo de 10 %.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bebida contendo polpa do Maracujá da Caatinga se mostrou um veículo ideal à fermentação por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, que apresentou alta viabilidade nas condições fermentativas e durante o armazenamento. A viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469 permaneceu acima de 10^9 UFC/mL durante os 28 dias de armazenamento à 4°C para as 3 condições analisadas (B1, B2 e B3), sendo a condição B1, suco com o inóculo proveniente do MRS, que apresentou maior estabilidade quanto à viabilidade durante o armazenamento.

A encapsulação de *L. rhamnosus* pela técnica de extrusão é eficaz, uma vez que as eficiências da encapsulação ficaram acima de 75 %, sendo possível otimizar o encapsulamento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 usando pectina e CaCl_2 . A secagem das cápsulas úmidas por liofilização se mostrou um método adequado, visto que as eficiências após a liofilização ficaram acima de 70 % para as quatro condições de liofilizados analisadas. Quanto à caracterização das cápsulas, a secagem foi eficiente para reduzir a umidade nas cápsulas não liofilizadas de 97,3 % para 6,38, 8,38, 8,46 e 8,65 % em L1, L2, L3 e L4, respectivamente, e o tamanho foi dentro do esperado para cápsulas produzidas pelo método de extrusão.

A liofilização pode ser avaliada em relação a múltiplos fatores, como eficiência e viabilidade/sobrevivência durante o armazenamento. Cinco sucos probióticos contendo células livres, encapsuladas e encapsuladas/liofilizadas foram formulados à base do suco do Maracujá da Caatinga. A presença de sacarose e/ou polpa nas cápsulas liofilizadas diminuiu a manutenção nos sucos probióticos. Todos os sucos probióticos apresentaram estabilidade no pH e na produção de ácido láctico. Produtos contendo células livres e encapsuladas poderiam ser recomendados para 120 dias de armazenamento refrigerado.

REFERÊNCIAS

ALANDER, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied Environmental Microbiology**, 65, 351–354, 1999.

ALBADRAN, H. A., CHATZIFRAGKOU, A., KHUTORYANSKIY, V. V., & CHARALAMPOPOULOS, D. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, 74, 208– 216, 2015.

ANDRADE, RAÍSSA HOLANDA CAVALCANTI DE. Estabilidade e aceitabilidade de sucos probióticos de goiaba (*Psidium guajava* L.) contendo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Dep. De Nutrição, Recife, PE, Brazil, 2017.

ARAÚJO, A. J. B., OLIVEIRA, S. B., COSTA, F. F. P., AZEVEDO, L. C., ARAUJO, F. P. Caracterização físico-química da semente de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 22, 2010, Salvador.

ARAÚJO, F. P. Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no Semi-Árido brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, Brasil, 94p, 2007.

ARAÚJO, F. P., KIILL, L. H. P., & SIQUEIRA, K. M. M. Maracujá do mato: alternativa agroindustrial para o Semi-Árido. Embrapa, Petrolina, PE. Folder, 2016.

ARAÚJO, F. P., Santos, C. A. F., MELO, N. F. Propagação vegetativa do maracujá do mato: espécie resistente à seca, de potencial econômico para agricultura de sequeiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, Instruções Técnicas, 61, 2004.

ARAÚJO, F. P., SANTOS, C. A. F., SILVA, G. C., ASSIS, J. S. Caracterização de frutos de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) cultivado em condições de sequeiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53, Recife, 2012.

ARAÚJO, F. P., SILVA, N., DE QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30, 723 – 730, 2008.

AZOUBEL, P. M., DE BRITO ARAÚJO, A. J., DE OLIVEIRA, S. B. AMORIM, M. R., & OLIVEIRA, S. S. B. Processo agroindustrial: aproveitamento da polpa de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) para a fabricação de estruturado de frutas. Comunicado Técnico, EMBRAPA, 143, 2010.

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

BEVILACQUA, A., CAMPANIELLO, D., CORBO, M. R., MADDALENA, L., & SINIGAGLIA, M. Suitability of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus plantarum* as Probiotics Intended for Fruit Juices Containing Citrus Extracts. **Journal of Food Science**, 78, 1764 – 1771, 2013

BOSCARIOLI, M. P. M. Influência de prebióticos na encapsulação de probióticos adicionados em sorvete. *Dissertação*. Escola de Engenharia de Mauá, São Caetano do Sul, SP, Brazil, 2010.

BRASIL (2016). EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA. Maracujá - BRS Sertão Forte (BRS SF). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/3450/maracuja---brs-sertao-forte-brs-sf>. Acessado em: 09/11/2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de

saúde em sua rotulagem. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Estabelece o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 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. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC N.º 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprovare gulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br)

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

BROECKX, G., VANDENHEUVEL, D., CLAES, I. J. J., LEBEER, S., & KIEKENS, F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, 505(1-2), 303–318, 2016.

BRON, P. A., & KLEEREBEZEM, M. Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. **Bioengineered Bugs**, 2, 80-87, 2011

BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M., & SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, 104, 467–483, 2011.

BYOND, H., MIN-TZE, L., & SY-BING, C. Functional foods: Probiotics, Prebiotics and Symbiotics. In.: Ravishankar, R. V.; Jamuna, A, B. **Beneficial Microbes in Fermented and functional foods**. Londres: Editora CRC press, 2014, cap.2.

CAI, Y. Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. In: ZHANG, H.; CAI, Y. London, Editora Springer, cap. 1, 2, and 5, 2014

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

CANTERI, M. H. G., MORENO. L., WOSIACKI, G., & SCHEER, A. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, 22, 2 149-157, 2012.

CARAMIA, G., ATZEI, A., & FANOS, V. Probiotics and the skin. **Clinics in Dermatology**, 26, 4-11, 2008.

CASAROTTI, S. N., & PENNA, A. L. P. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. **International Dairy Journal**, 41, 1 – 6, 2015.

CASTRO, C. D. P. & RYBKA, A. C. P., Processamento do maracujá-da-caatinga 'BRS Sertão Forte': elaboração de geleia. Instruções Técnicas, EMBRAPA, 2016.

CHAMPAGNE, C. P., ROSS, R. P., SAARELA, M., HANSEN, K. F., & CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, 149, 185–193, 2011.

- CHANG, C. P., & LIEW, S. L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, 37, 536–543, 2012.
- COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, 162, 56 – 67, 2012.
- CORBO, M. R., BEVILACQUA, A., GALLO, M., SPERANZA, B., & SINIGAGLIA, M. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 18, 196–201, 2013.
- CORONA, O., RANDAZZO, W., MICELI, A., GUARCELLO, R., FRANCESCA, N., ERTEN, H., MOSCHETTI, G., & SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, 66, 572 – 581, 2016.
- COSTA, G. M., CARVALHO SILVA, J. V., MINGOTTI, J. D., BARÃO, C. E., KLOSOSKI, S. J., & PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, 75, 195–201, 2017.
- COSTA, M. G. M., FONTELES, T. V., DE JESUS, A. L. T., & RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimization and product stability. **Food Chemistry**, 139, 261–266, 2013.
- DAFE, A., ETEMADI, H., DILMAGHANI, A., & MAHDAVINIA, G. R. Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, 97, 536–543, 2017.

DARILMAZ, D. O., & BEYATLI, Y. Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. **Anaerobe**, 18, 122-127, 2012.

DAVIS, ANGELA. Frase proferida em palestra. Em Universidade Federal da Bahia, 27/07/2017.

DE MAN, J. C., ROGOSA, M., & SHARPE, M. E. A. Medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, 23, 130–135, 1960.

DE OLIVEIRA, F. E., ROSSONI, R. D., DE BARROS, P. P., BEGNINI, B. E., JUNQUEIRA, J. C., JORGE, A. O. C., & DE OLIVEIRA, L. D. Immunomodulatory effects and anti- *Candida* activity of lactobacilli in macrophages and in invertebrate model of *Galleria mellonella*. **Microbial Pathogenesis**, 110, 603–611, 2017.

DE VOS, P., FAAS, M. M., SPASOJEVIC, M., & SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, 20, 292–302, 2010.

DE VOS, P., LAZARJANI, H. A., PONCELET, D., & FAA, M. M. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 67, 15 – 34, 2013.

DIBNER, J. J., & BUTTIN, P. 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, 2002.

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

DIEPERS, A.-C., KRÖMKER, V., ZINKE, C., WENTE, N., PAN, L., PAULSEN, K., & PADUCH, J. H. In vitro ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 5, 84–92, 2017.

DINLEYICI et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. **Jornal de Pediatria**, 91, 392-396, 2015.

DO ESPÍRITO SANTO, A. P., PEREGO, P., CONVERTI, A., & OLIVEIRA, M. N. Influence of food matrices on probiotic viability-A review focusing on the fruity bases. **Trends Food Science and Technology**, 22, 377-385, 2011.

DOUILLARD et al. Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Strain GG. **PLOS Genetics**, 9, 1923–1933, 2013.

ECKERT, C., AGNOL, W. D., DALLÉ, D., SERPA, V. G., MACIEL, M. J., LEHN, D. N., & VOLKEN DE SOUZA, C. F. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of *Lactobacillus* spp. from adverse conditions. **Food Research International**, 113, 65–73, 2018.

EL AILA, et al. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. **BMC Infectious Diseases**, 9, 167, 2009.

ELLENDERSEN, L. S. N., GRANATO, D., GUERGOLETTA, K., B., & WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**, 12, 475–485, 2012.

ETCHEPARE, M., RADDATZ, G. C., DE MORAES FLORES, É. M., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., BARIN, J. S., DE MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, 65, 511–517, 2016.

European Food and Feed Cultures Association. (EFFCA). Definition of microbial food culture. 2003. Disponível em: <http://www.effca.org/>. Acessado em: 17 de Janeiro de 2017.

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.**

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**, 71, 149 – 154, 2016.

FARIAS, N.; SOARES, M. & GOUVEIA, E. Validation of an ion exclusion-hplc method for simultaneous determination of citric, malic and lactic acids in fermented passion fruit. In:

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Láticas e Aplicação Tecnológica de Bactérias Probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção.** São Paulo: Editora Rubio, 2012, cap. 1.

FIGUEROA-GONZALEZ, I., QUIJANO, G., RAMIREZ, G., & CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. **Journal of Science Food Agriculture**, 91, 1341–1348, 2011.

FILANNINO, P., BAI, Y., DI CAGNO, R., GOBBETTI, M., & GANZLE, M. G. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. **Food Microbiology**, 46, 272 – 279, 2015.

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

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Pectina. São Paulo: UBM Brazil Feiras & Eventos Ltda, 2014, p. 47 – 53. Disponível em: www.revista-fi.com.br. Acessado em: 19/08/2018.

FRAEYE, I., COLLE, I., VANDEVENNE, E., DUVETTER, T., VAN BUGGENHOUT, S., MOLDENAERS, P., HENDRICKX, M. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 11, 401–409, 2010

GAMALLAT et al. *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 83, 536–541, 2016.

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

GAWKOWSKI, D & CHIKINDAS, M. L. Non-dairy probiotic beverages: the next step into human health. **Beneficial Microbes**, 4, 127-142, 2013.

GEBARA, C., CHAVES, S. K., 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**, 54, 552-556, 2011.

GHIBAUDO, F., GERBINO, E., CAMPO DALL' ORTO, V., & GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Pectin-iron capsules: Novel system to stabilise and deliver lactic acid bacteria. **Journal of Functional Foods**, 39, 299–305, 2017.

GRANATO, D., BRANCO, G. F., NAZZARO, F., CRUZ, A. G., & FARIA, J. A. F. Functional Foods and Non-dairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 9, 292-302, 2012.

HALIM, M., MUSTAFA, N. A. M., OTHMAN, M., WASOH, H., KAPRI, M. R., ARIFF, A. B. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT - Food Science and Technology**, 81, 210 – 216, 2017.

HANSEN, P.A, & LESSEL, E.F. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 21, 69-71, 1971.

HEIDEBACH, T., FÖRST, P., & KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, 23, 1670–1677, 2009.

HOJSAK, I., ABDOVIC, S., SZAJEWSKA, H., MILOSEVIĆ, M., KRZNNARIC, Z., & KOLACEK, S. *Lactobacillus* G.G. in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. **Pediatrics**, 125, 1171 – 1177, 2010.

HOLKEM, A. T., RADDATZ, G. C., NUNES, G. L., CICHOSKI, A. J., JACOB-LOPES, E., FERREIRA GROSSO, C. R., & DE MENEZES, C. R. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, 71, 302–308, 2016.

HUABÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, 46, 205–229, 2003.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (IAL). Métodos físico-químicos para análise de alimentos (4th ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020, 2008.

International Life Sciences Institute (ILSI). Concepts of functional foods. 2002. Disponível em: <http://ilsi.org/>. Acessado em: 17 de Janeiro de 2017.

- KANKAINEN, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences in United States of America**, 106, 17193–17198, 2009.
- KASTNER, H., EINHORN-STOLL, U., & SENGE, B. Structure formation in sugar containing pectin gels – Influence of Ca²⁺ on the gelation of low-methoxylated pectin at acidic pH. **Food Hydrocolloids**, 27, 42–49, 2012.
- KHANDELWAL, P., GASPAR, F. B., CRESPO, M. T. B., & UPENDRA, R. S. Lactic Acid Bacteria: General Characteristics, Food preservation and health benefits. In: Montet, d. and Ray, r. c. **Fermented Foods. Part I: Biochemistry and Biotechnology**. Londres, Editora: crc press, 2016, cap. 8.
- KOWALEZYK, M., MAYO, B., FERNADEZ, M., & ALEKSANDRZAK, T. Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light “Omic” Technology. In: Mozzi, F., Raya, R. R. And Vignolo, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. UK, Editora: Wiley blackwell, 2 ed., 2016, cap. 1.
- KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., & DEETH. H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, 13, 3–13, 2003.
- KUMAR, M., NAGPAL, R., KUMAR, R., HEMALATHA, R., VERMA, V., & KUMAR, A. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. **Experimental Diabetes Research**, 902-917, 2012.
- LACOMBE, A., MCGIVNEY, C., TADEPALLI, S., SUN, X., & WU, V. C. H. The effect of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) constituents on the growth inhibition, membrane integrity, and injury of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in comparison to *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Microbiology**, 34, 352–359, 2013.
- LACOMBE, A., WU, V. C. H., WHITE, J., TADEPALLI, S., & ANDRE, E. E. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional

components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Microbiology**, 30, 124–131, 2012.

LAHTINEN, S., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S., & WRIGHT, A. V. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. IN: Lahtinen, S.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S.; Wright, A. V. London, Editora CRC Press, ed. 4, 2011, cap. 1, 2 and 5.

LAM, P. L., & GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, 178, 25–45, 2014.

LARSEN, N., CAHÚ, T. B., ISAY SAAD, S. M., BLENNOW, A., & JESPERSEN, L. The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. **Food Microbiology**, 74, 11–20, 2018.

LI, P., ZHOU, Q., & GU, Q. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins. **Journal of Biotechnology**, 234, 66–70, 2016.

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

LIMA, A. A. & CUNHA, M. A. P. Maracujá: produção e qualidade na passicultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. 396 p. 2004.

MARIANELLI, C., CIFANI, N., & PASQUALI, P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. **Research in Microbiology**, 161, 673 – 680, 2010.

MARTÍN, M. J., LARA-VILLOSLADA, F., RUIZ, M. A., & MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different Technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 27, 15-25, 2015.

MENEZES, C. R., BARIN, J. S., CHICOSKI, A. J., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., FRIES, L. L. M., TERRA, N. N. T. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, 3, 36-41, 2013.

MENEZES, M. F. S. C., RODRIGUES, L. Z., CAVALHEIRO, C. P., ETCHEPARE, M. A., MENEZES, C. R. Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina. **Ciência e Natura**, 37, 30 – 37, 2015.

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

MOORTHY, G., PHIL, M., MURALI, M. R., & DEVARAJ, S. N. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. **Nutrition**, 25, 350–358, 2009.

MOREIRA et al. Development of a juçara and Uba mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT - Food Science and Technology**, 77, 259 – 268, 2016.

MORITA, H., TOH, H., OSHIMA, K., MURAKAMI, M., TAYLOR, T. D., IGIMI, S., & HATTORI, M. Complete Genome Sequence of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. **Journal Bacteriology**, 191, 7630 – 7631, 2009.

MOUMITA, S., DAS, B., HASAN, U., & JAYABALAN, R. Effect of long-term storage on viability and acceptability of lyophilized and spray-dried synbiotic microcapsules in dry functional food formulations. **LWT- Food Science and Technology**, 96, 127–132, 2018.

MOUMITA, S., GODERSKA, K., JOHNSON, E. M., DAS, B., INDIRA, D., YADAV, R. & JAYABALAN, R. Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in-vitro gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage. **LWT- Food Science and Technology**, 77, 460–467, 2017.

MOUSAVI, Z. E., MOUSAVI, S. M., RAZAVI, S. H., EMAM-DJOMEH, Z., & KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27, 123–128, 2011.

NATURAL PRODUCT INSIDER. Probiotics. Disponível em:
<http://www.naturalproductsinsider.com/search.aspx?term=probiotics>. Acessado em:
20/11/2016.

NEDOVIC, V., KALUSEVICA, A., MANOJLOVIC, V., LEVICA, S., & BUGARSKIB, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, 1, 1806 – 1815, 2011.

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

NUALKAEKUL, S., & CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, 46, 111–117, 2011.

NUALKAEKUL, S., COOK, M. T., KHUTORYANSKY, V. V., & CHARALAMPOPOULOS, D. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit. **Food Research International**, 53, 304 – 311, 2013.

NUALKAEKUL, S., LENTON, D., COOK, M. T., KHUTORYANSKIV, V. V., & CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, 90, 1281–1287, 2012.

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

OLIVEIRA, J. C., & RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

OLIVEIRA, M. X., SÃO JOSÉ, A. R., REBOUÇAS, T. N. H., MORAIS, O. M., & DOURADO, F. W. N. SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora cincinnata* MAST.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 2, p. 584-590, 2010.

Orla-Jensen, S. The lactic acid bacteria. E. Munksgaard, Kldbenhavn, 1919.

PAKBIN, B., RAZAVI, S. H., MAHMOUDI, R., & GAJARBEYGI, P. Producing Probiotic Peach Juice. **Biotechnonology and Health Science**, 1, 1 – 5, 2014.

PATEL, R. M., & UNDERWOOD, M. A. Probiotics and necrotizing enterocolitis. **Seminars in Pediatric Surgery**, 27, 39–46, 2018.

PATEL, S. & GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **Biotechnonology**, 2, 115–125, 2012.

PATIL, J. S., KAMALAPUR, M. V., MARAPUR, S. C., & KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 5, 241–248, 2010.

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 Technology**, 6, 3155–3165, 2013.

PERES, C. M., PERES, C., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., & MALCATA, F. X. 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, 2012.

- PERRICONE, M., BEVILACQUA, A., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., & CORBO, M. R. Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages**, 1, 95-103, 2015.
- PERRICONE, M., CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M., SPERANZA, B., & BEVILACQUA, A. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. **Journal of Functional Foods**, 10, 421-426, 2014.
- PIMENTEL, T. C., MADRONA, G. S., GARCIA, S., PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, 63, 415-422, 2015.
- PITA, J. S. L. Physico-chemical and nutritional characterization of the pulp and flour passion fruit peel the bush and yellow. Dissertação. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade da Bahia, Bahia, 28-36, 2012.
- PITINO et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, 31, 57–63, 2012.
- RANADHEERA, R.D.C.S., BAINES, S.K., & ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, 43, 1-7, 2010.
- RANDAZZO, C. L., PITINO, I., LICCIARDELLO, F., MURATORE, G., & CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. **Food Science and Technology**, 33, 652-659, 2013.
- RATHORE, S., DESAI, P. M., LIEW, C. V., CHAN, L. W., & HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, 116, 369–381, 2013.
- RAY, S., RAYCHAUDHURI, U., & CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, 13, 76–83, 2016.

REN et al. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by in vivo tests. **Anaerobe**, 35, 22-27, 2015.

RIBEIRO, M. C. E., CHAVES, K. S., GEBARA, C., INFANTE, F. N. S., GROSSO, C. R. F., & GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, 66, 424–431, 2014.

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

ROSSI, A., ROSSI, T., BERTINI, M., & CACCIA, G. The use of *Lactobacillus rhamnosus* in the therapy of bacterial vaginosis Evaluation of clinical efficacy in a population of 40 women treated for 24 months. **Archives Gynecology Obstetrics**, 281, 1065-1069, 2010.

RYBKA, A. C. P. Elaboração de barra de cereal sabor maracujá-do-mato. Petrolina: Embrapa Semiárido, Comunicado Técnico, 163, 2015.

RYBKA, A. C. P., CASTRO, C. D. P., LIMA, A., FERREIRA, M. A., & PEREIRA, R. Elaboração de geleia de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) BRS Sertão Forte. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE GASTRONOMIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2, Fortaleza, 2016.

SAARELA, M., ALAKOMI, H. L., MÄTTÖ, J., AHONEN, A. M., PUHAKKA, A., & TYNKKYNEN, S. Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. **International Journal of Food Microbiology**, 149, 106–110, 2011.

SALMERÓN, I., THOMAS, K., & PANDIELLA, S. S. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. **Jornal of functional foods**, 15, 106 – 115. 2015.

SÁNCHEZ, M. T., RUIZ, M. A., LASSERROT, A., HORMIGO, M., & MORALES, M. E. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: Protection, survival and stability study. **Food Hydrocolloids**, 69, 67–75, 2017.

SANDOVAL-CASTILLA, O., LOBATO-CALLEROS, C., GARCÍA-GALINDO, H. S., ALVAREZ-RAMÍREZ, J., & VERNON-CARTER, E. J. Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, 43, 111–117, 2010.

SANTOS, E., ANDRADE, R., GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, 20, 56–61, 2017.

SANTOS, R. C. S., FINKLER, L., & FINKLER, C. L. L. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, 31, 759–767, 2014.

SEQUEIRA, C. B. Analysis of sugars and organic acids in commercial juices: application of HPLC -SEC -UV -IR and electronic language. Dissertação. Instituto Politécnico, Bragança, 2012.

SHAH, N. P., DING, W. K., FALLOURD, M. J., & LEYER, G. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. **Journal of Food Science**, 75, 278–282, 2010.

SHARMA, V., & MISHRA, H. N. 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, 2014.

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**, 8, 279–284, 2007.

SHOJI, A. S., OLIVEIRA, A. C., BALIEIRO, J. C. C., FREITAS, O., THOMAZINI, M., HEINEMANN, R. J. B., FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L. acidophilus*

microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, 91, 83–88, 2013.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, 13, 1–8, 2016.

SILVA, A. C. C., SILVA, N. A., PEREIRA, M. C. S. & VASSIMON, H. S. Alimentos contendo ingredientes funcionais em sua formulação: Revisão de artigos publicados em revistas brasileiras. **Revista Conexão Ciência**, 11, 133 – 144, 2016.

SILVA, T. M., LOPES, E. J., CODEVILLA, C. F., CICHOSKI, A. J., FLORES, É. M. DE M., MOTTA, M. H., DE MENEZES, C. R. Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, 90, 412–417, 2018.

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 Technology**, 5, 947 – 953, 2010.

SOUSA, A. A., RODRIGUES, L. S., ARAÚJO, A. J. B., SANTOS, J. C., SILVA, I. R. A., & ARAUJO, F. P. Elaboração, aceitabilidade e intenção de compra de iogurte saborizado com polpa de maracujá do mato. In: CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 8, Salvador, 2013.

SOUSA, R. C. P., SANTOS, D. C., NEVES, L. T. B. C., & CHAGAS, E. A. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. **Revista AgroAmbiente**, 7, 366-372, 2013..

SOUZA, F. N, GEBARA, C., RIBEIRO, M. C. E, CHAVES, K. S., GIGANTE, M. L., & GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, 49, 560–566, 2012.

SOUZA, L. B. et al. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 127 v. 34, n. 3, p. 832-839, 2012.

TOMÁS, M. S., DE GREGORIO, P. R., LECCESE TERRAF, M. C., & NADER-MACÍAS, M. E. F. Encapsulation and subsequent freeze-drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 79, 87–95, 2015.

TORREZAN, R., SILVA, B. S. G., TEIXEIRA, N. S., OLIVEIRA, A. H., SILVA, L. F. M., ARAUJO, F. P., & MATTA, V. M. Processamento de molho "Chutney" composto de maracujá da Caatinga e manga. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, Comunicado Técnico, 213, 2015.

TOSCANO, M., DE GRANDI, R., MINIELLO, V. L., MATTINA, R., & DRAGO, L. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. **Digestive and Liver Disease**, In progress, 2016.

TRIPATHI, M. K., & GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, 9, 225 – 227, 2014.

TYNKKYNEN, S., SATOKARI, R., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., & SAXELIN, M. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* Strains. **Applied Environmental Microbiology**, 65, 3908–3914, 1999.

VALENZUELA, J. F., PINUER, L. A., CANCINO, A. G., & YÁÑEZ, R. B. Metabolic Fluxes in Lactic Acid Bacteria—A Review. **Food Biotechnology**, 29, 185–217, 2015.

VANDENPLAS, Y., HUYSBE, G., & DAUBE, G. Probiotics: an update. **Journal of Pediatrics**, 91, 6 – 21, 2015.

VARSHA, V. V. & NAMPOOTHIRI, K. M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control**, 69, 61 – 64, 2016.

VAZIRI, A. S., ALEMZADEH, I., VOSSOUGH, M., & KHORASANI, A. C. Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 199, 266–275, 2018.

VOO, W., RAVINDRA, P., TEY, B., CHAN, E. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 111, 294–299, 2011.

WOOD, B. J. B & HOLZAPFEL, W. H. The genera of lactic acid bacteria. **Glasgow: Blackie Academic & Professional**, 6 – 35, 1995.

XU, M., GAGNÉ-BOURQUE, F., DUMONT, M.-J., & JABAJI, S. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**, 168, 52–59, 2016.

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

ZHANG et al. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. **Microbiological Research**, 167, 27–31, 2011.

ZUCARELI, V., FERREIRA, G., AMARO, A. C. E., ARAÚJO, F. P. Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Sementes**, 31, 106 – 114, 2009.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO

LWT - Food Science and Technology 71 (2016) 149–154



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt



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*

Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil
