

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

ROBERTA MARIA LINS MENDES

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS
FERMENTADAS E SIMBIÓTICAS DO MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora
cincinnata*)**

**RECIFE
2022**

ROBERTA MARIA LINS MENDES

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS
FERMENTADAS E SIMBIÓTICAS DO MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora
cincinnata*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco na área de concentração Ciência dos Alimentos para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Ester Ribeiro de Andrade

Co-orientador: Prof. Fernando Hallwass

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

M538a Mendes, Roberta Maria Lins.
Avaliação da viabilidade do processo de produção de bebidas fermentadas e simbióticas do maracujá da caatinga (*Passiflora cincinnata*) / Roberta Maria Lins Mendes. – 2022.
96 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Ester Ribeiro de Andrade.
Coorientador : Fernando Hallwass.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2022.

Inclui referências e apêndice.

1. Lactobacillus rhamnosus. 2. Passiflora cincinnata. 3. Probióticos. 4. Pectina. 5. Simbióticos. I. Andrade, Ester Ribeiro de (Orientadora). II. Hallwass, Fernando (Coorientador). III. Título.

613.28

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2023-029)

ROBERTA MARIA LINS MENDES

Tese

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS
FERMENTADAS E SIMBIÓTICAS DO MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora
cincinnata*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco na área de concentração Ciência dos Alimentos para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em: 30/11/2022

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Jenyffer Medeiros Campos Guerra
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rafael Augusto Batista de Medeiros
Instituto Federal de Pernambuco

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

Prof^a Dr^a Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Laênia Angélica Andrade Lopes
Faculdade São Francisco da Paraíba

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe Ione (in memoriam), com ela aprendi a lutar pelos meus ideais e nunca desistir daquilo que acredito. Sei que de onde estiver, ela está comemorando mais esta conquista comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e guiar meus passos em todos os momentos importantes e difíceis em minha vida, me trazendo o discernimento necessário para minhas escolhas. Estes anos não foram fáceis, estudar e trabalhar não é uma tarefa fácil, sobretudo quando passamos por uma crise mundial que foi a pandemia do COVID-19. Passamos mais de um ano sem acesso aos laboratórios, perdi meus experimentos por problemas estruturais da universidade, pensei em desistir inúmeras vezes e hoje tenho certeza que sem a fé e pensamentos positivos para que tudo desse certo talvez eu não estivesse chegado até aqui.

A meu pai e irmã (Roberto Mendes e Raphaela Mendes) por todo amor, carinho e apoio durante todas as etapas da minha formação. A minha mãe Ione, que infelizmente não está aqui fisicamente para presenciar mais esta conquista, pois em agosto de 2021 nos deixou, tornando-se um anjo para proteger e iluminar nossa família.

A minha querida orientadora Ester Ribeiro, pela paciência, apoio e dedicação ao meu trabalho, pelo carinho com alunos do LabBio e pelos ensinamentos durante este tempo de convivência. Pude contar sempre com seu apoio pessoal e profissional.

Aos que fazem parte do LabBio, e pelos que passaram por lá e tive o prazer de conhecer (Mariana Santos, Zilmar Pimenta, Raissa Andrade, Eloyza Rozendo, Gabriel Barbosa, Arthur Victor e outros) em especial a Maryana Santos que me auxiliou de forma tão cuidadosa, fomos parceiras durante os experimentos e sua ajuda foi fundamental na condução do estudo.

Ao meu Co-orientador Prof. Fernando Hallwass, pela colaboração e disponibilidade na realização da pesquisa.

A Professora Patrícia Azoubel do Departamento de Engenharia Química da UFPE e sua aluna Shirley, Professor Felix do IPA – Instituto Agrônomo de Pernambuco, Fábio e Raiane que mesmo sem nenhum vínculo com o trabalho colaboraram para que fosse desenvolvido e concluído.

A Universidade Federal de Pernambuco, instituição que me orgulho em fazer parte, aqui fiz amigos, cresci pessoal e profissionalmente.

Por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, incluindo Professores e Colaboradores em especial a secretaria da Pós-Graduação pelos ensinamentos e serviços prestados sempre de forma solícita e acolhedora

Muito Obrigada!

“Desejar é o primeiro passo para a conquista de nossos sonhos.”
(Desconhecido)

RESUMO

A associação de microrganismos probióticos com ingredientes prebióticos resulta em produtos simbióticos. *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 é um bom exemplo de linhagem probiótica com potencial na elaboração de bebidas simbióticas à base de frutas, matrizes alimentares não lácteas alternativas em substituição a produtos à base de leite. O maracujá da Caatinga (MC) (*Passiflora cincinnata*) é um fruto de baixo custo que permite um aproveitamento integral, onde polpa, casca e sementes podem ser utilizadas. A pectina extraída da casca, é fonte de fibras solúveis e promove efeitos fisiológicos benéficos ao organismo humano devido à sua ação prebiótica. O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade do processo de produção de bebidas simbióticas, usando o MC, *L. rhamnosus* ATCC 7469 como probiótico e a pectina extraída da farinha de sua casca como prebiótico. Foram desenvolvidas 11 bebidas com as mesmas concentrações de polpa de maracujá (50%) fermentadas durante 24 horas, posteriormente foram adicionadas pectina e sacarose de acordo com a aplicação de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para determinação das melhores condições em relação à sobrevivência do probiótico após 28 dias de estoque refrigerado. A extração da pectina da casca do MC para elaboração das bebidas foi realizada utilizando ácido cítrico e seu rendimento foi de 70,4% ($\pm 2,4$). De acordo com o DCCR observou-se que a concentração de pectina foi uma variável com efeito positivo significativo na sobrevivência de *L. rhamnosus* e sua viabilidade foi mantida em quantidade suficiente para atender aos requisitos preconizados pela legislação de alimentos probióticos. As bebidas fermentadas contendo 5% de sacarose e 20g/L de pectina (E3) e 10% de sacarose e 12,5 g/L de pectina (PC) foram submetidas ao teste de simulação gastrointestinal e apresentaram sobrevivência de 68,8% e 66,1% respectivamente. O maracujá da Caatinga se mostrou uma matriz não láctea favorável tanto para extração da pectina, quanto para a produção de bebidas simbióticas, mantendo estável a viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante estoque. A partir dos resultados do DCCR foi possível identificar que a pectina foi a variável que exerceu efeito positivo na sobrevivência, bem como as concentrações que permitiram mantê-la acima de 90%. A linhagem probiótica também foi capaz de manter a sobrevivência após simulação das condições do trato gastrointestinal, se mostrando um excelente probiótico com boa capacidade de adaptação mesmo em matrizes alimentares não lácteas.

Palavras - chave: *Lactobacillus rhamnosus*; *Passiflora cincinnata*; probióticos; pectina, simbióticos.

ABSTRACT

The association of probiotic microorganisms with prebiotic ingredients results in symbiotic products. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 is a good example of a strain with potential in the development of fruit-based beverages, alternative non-dairy food matrices to replace milk-based products. The passion fruit from Caatinga (PFC) (*Passiflora cincinnata*) is a low-cost fruit that allows full use, where pulp, peel and seeds can be used. Pectin extracted from the bark is a source of soluble fiber and promotes beneficial physiological effects to the human body due to its prebiotic action. The objective of the study was to evaluate the viability of the production process of symbiotic drinks, using PFC, *L. rhamnosus* ATCC 7469 as a probiotic and pectin extracted from its peel flour as a prebiotic. Eleven beverages were developed with the same concentrations of passion fruit pulp (50%) fermented for 24 hours, later pectin and sucrose were added according to the application of a Central Composite Rotatable Design (CCRD) to determine the best conditions in relation to survival of the probiotic after 28 days of refrigerated storage. The extraction of pectin from the PFC bark to prepare the beverages was carried out using citric acid and its yield was 70.4% (± 2.4). According to the CCRD, it was observed that the pectin concentration was a variable with a significant positive effect on the survival of *L. rhamnosus* and its viability was maintained in sufficient quantity to meet the requirements established by the legislation on probiotic foods. Fermented beverages containing 5% sucrose (E3) and 20% pectin and 10% sucrose and 12.5% pectin (PC) were submitted to the gastrointestinal simulation test and showed survival rates of 68.8% and 66.1% respectively. Caatinga passion fruit proved to be a favorable non-dairy matrix both for pectin extraction and for the production of symbiotic beverages, keeping the viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469 stable during storage. From the results of the CCRD it was possible to identify that pectin was the variable that had a positive effect, as well as the concentrations that allowed to maintain the survival of *L. rhamnosus* above 90%. The strain was also able to maintain survival after simulating adverse conditions in the gastrointestinal tract, proving to be an excellent probiotic with good adaptability even in non-dairy food matrices.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*; *Passiflora cincinnata*; probiotics; pectin; symbiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ilustração das características desejáveis dos probióticos.	23
Figura 2 –	Esquema ilustrativo da estrutura molecular da pectina.	30
Figura 3 –	Frutos do Maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis</i>).	37
Figura 4 –	Frutos do Maracujá da Caatinga (<i>Passiflora cincinnata</i>).	37
Figura 5 –	Moinho de facas utilizado para produção da farinha das cascas dos maracujás.	42
Figura 6 –	Esquema ilustrativo da determinação da viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469.	48
Figura 7 –	Esquema ilustrativo do teste de simulação gastro-intestinal para verificação da sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 nas bebidas simbióticas.	50
Figura 8 –	Fases da obtenção da farinha da casca do maracujá da Caatinga.	52
Figura 9 –	Pectina extraída da farinha da casaca do maracujá da Caatinga.	55
Figura 10 –	Espectro de RMN ^1H 400 MHz. da Amostra 1 (pectina comercial) 20 mg em D_2O .	58
Figura 11 –	Espectro de RMN ^1H 400 MHz. da Amostra 2 (pectina MCI) 20 mg em D_2O .	59
Figura 12 –	Viabilidade média de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 no início (T=0 dias) e ao final (T = 28 dias) do estoque.	62
Figura 13 –	Superfície de resposta obtida para sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> após estoque de 28 dias, em função das concentrações de sacarose e pectina nas bebidas simbióticas fermentadas de maracujá da Caatinga.	65
Figura 14 –	Variação nas concentrações dos ácidos cítrico e málico ao avaliar a diferença no início (T=0 dias) e ao final do estoque (T= 28 dias).	70

Figura 15 – Concentração de ácido láctico nos ensaios no início (T=0) e ao final (T=28 dias) do estoque. **71**

Figura 16 – Concentração de açúcares redutores totais (ART) no início e ao final do estoque. **73**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores e níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).	46
Tabela 2 – Matriz do planejamento para elaboração das bebidas. Sendo x_1 e x_2 os valores codificados de sacarose e pectina respectivamente.	47
Tabela 3 – Composição centesimal da farinha da casca do MC.	53
Tabela 4 – Modelo experimental do DCCR e respostas obtidas. O ponto central (PC) corresponde aos ensaios E5, E6 e E7.	63
Tabela 5 – Análise da variância (ANOVA) do modelo linear do planejamento fatorial.	64
Tabela 6 – Variações de pH nos ensaios no início e ao final do estoque. O ponto central (PC) corresponde aos ensaios E5, E6 e E7.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Açúcares Redutores Totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DEQ	Departamento de Engenharia Química
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GE	Grau de Esterificação
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
LABBIO	Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos
LEEAL	Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TGI	Trato Gastrointestinal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	MICROBIOTA HUMANA	20
2.2	PROBIÓTICOS E SEUS BENEFÍCIOS A SAÚDE	22
2.2.1	Uso de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> como probiótico	24
2.3	ALIMENTOS PROBIÓTICOS DE ORIGEM NÃO LÁCTEA	26
2.4	PECTINA	29
2.4.1	Propriedades Prebióticas da Pectina	32
2.5	ALIMENTOS SIMBIÓTICOS	34
2.6	MARACUJÁ DA CAATINGA	35
3	OBJETIVOS	39
3.1	3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	LOCAL	40
4.2	MATERIAIS	40
4.3	PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DE <i>L. RHAMNOSUS</i> ATCC 7469	41
4.4	OBTENÇÃO DA POLPA DE MARACUJÁ	41
4.5	OBTENÇÃO DA FARINHA DA CASCA DO MARCUJÁ	41
4.6	EXTRAÇÃO DA PECTINA DA CASCA DO MARACUJÁ	42
4.7	GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DA PECTINA	43
4.8	CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCELAR (RMN)	44
4.9	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ DA CAATINGA	44

4.10	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)	45
4.11	PRODUÇÃO DAS BEBIDAS SIMBIÓTICAS	46
4.11.1	Meio de cultura	46
4.11.2	Produção de bebidas simbióticas	46
4.12	MÉTODOS ANALÍTICOS	48
4.12.1	Determinação do pH	48
4.12.2	Determinação da umidade	48
4.12.3	Determinação da viabilidade celular	48
4.13	DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS	49
4.14	DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATOS	49
4.14.1	Glicose e Frutose	49
4.14.2	Determinação dos açúcares redutores totais	49
4.15	SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	50
4.16	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	APROVEITAMENTO DA CASCA DO MARACUJÁ DA CAATINGA	52
5.2	RENDIMENTO DA PECTINA OBTIDA DA FARINHA DA CASCA DO MC	54
5.3	ESPECTROS DE RMN DA PECTINA	57
5.4	COMPORTAMENTO DAS BEBIDAS APÓS FERMENTAÇÃO	60
5.5	VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA DE <i>L. RHAMNOSUS</i> ATTC 7469 DURANTE O ESTOQUE REFRIGERADO	61
5.6	COMPORTAMENTO DO PH DAS BEBIDAS DURANTE O ESTOQUE	67
5.7	VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS E CARBOIDRATOS	69

5.8	SOBREVIVÊNCIA DE <i>L. RHAMNOSUS</i> APÓS SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7	REFERÊNCIAS	77
8	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO	91

1 INTRODUÇÃO

Na última década, um número crescente de evidências estabeleceu a saúde intestinal como um dos mais importantes fatores relacionados ao surgimento de doenças crônicas, incluindo síndrome metabólica e obesidade. A composição da microbiota intestinal é determinada por fatores genéticos e ambientais, sendo a dieta um contribuinte crítico para o seu equilíbrio (ALJUTAILY *et al.*, 2020). O uso de culturas probióticas exerce influência positiva sobre o trato gastrointestinal humano, e intervenções dietéticas representam estratégias promissoras para a modulação da microbiota, isto ocorre por meio do estímulo à multiplicação de microrganismos benéficos e consequente inibição do desenvolvimento de bactérias potencialmente prejudiciais, que reforça os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PAIXÃO & CASTRO, 2016; MAIA *et al.*, 2018).

As bactérias probióticas podem ser entregues ao intestino por meio de suplementos dietéticos ou através de fontes alimentares, incluindo produtos lácteos, como iogurte e Kefir, no entanto; apesar dos produtos probióticos serem majoritariamente incorporados em produtos à base de leite, é crescente a necessidade do desenvolvimento de alimentos provenientes de matrizes alimentares não lácteas, visto que a incidência de problemas de saúde relacionados ao consumo de leite e derivados, bem como o estilo de vida vegano, é crescente (ALVES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; ALJUTAILY *et al.*, 2020; MENDES *et al.*, 2021).

Sucos de frutas são excelentes opções na formulação de produtos funcionais, sobretudo quando associados a ingredientes prebióticos, resultando em bebidas simbióticas (COSTA *et al.*, 2020), no entanto; sua utilização é mais desafiadora em comparação com produtos lácteos, devido ao seu perfil de nutrientes e pH que podem acarretar em dificuldades de adaptação por parte de alguns probióticos (BARRERA *et al.*, 2019).

Entre as espécies com potencial de utilização na elaboração de bebidas probióticas e simbióticas está *Lacticaseibacillus rhamnosus*, no qual estudos têm demonstrado sua versatilidade, capacidade de crescimento e de manutenção da viabilidade em bebidas formuladas a partir de diferentes matrizes vegetais (CAMPOS *et al.*, 2019; MATHIPA-MDAKAME & THANTSHA, 2022).

O Maracujá da Caatinga (MC) (*Passiflora cincinnata* Mast), é uma planta tropical nativa do semiárido Nordeste, detentora de fruto com aroma característico e sabor exótico bastante apreciados por seus consumidores, que de acordo com estudos recentes, apresenta composição favorável de nutrientes para formulação de bebidas probióticas não lácteas (SANTOS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2021). Além disso, é uma fruta de baixo custo, que permite a sua utilização tanto da polpa para diversas aplicações como sucos, licores, geleias e outros, bem como da casca para extração da pectina, fibra solúvel amplamente conhecida por suas propriedades gelificantes, espessantes, estabilizantes.

A pectina presente nas cascas e bagaço de frutas, comumente descartadas pela indústria alimentícia, vem sendo bastante estudada por ser um ingrediente funcional em decorrência de suas características prebióticas. Ademais, investigações anteriores fazem referência a seus impactos na viabilidade, proteção e manutenção da sobrevivência dos probióticos (SANTOS, *et al.*, 2019; KHODAEI *et al.*, 2020).

Neste contexto, é importante explicar de que forma a pectina contribui na produção de produtos simbióticos e como a presença deste ingrediente funcional pode ser otimizada, tendo em vista a adição de outros carboidratos, como a sacarose por exemplo, de forma que seja mantido o valor nutricional do produto. Além disso, quando extraída de frutos como o maracujá da Caatinga, contribui para preservação do meio ambiente, diminuindo a geração de resíduos industriais, bem como no incremento da economia da região semiárida Nordeste onde o fruto é produzido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROBIOTA HUMANA

O intestino humano é colonizado por um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, conhecidos como microbiota. Em humanos, mais de 10^{14} microrganismos vivem no trato gastrointestinal (TGI), principalmente no intestino distal (AL-RASHIDI, 2021). O papel do intestino na saúde e nas doenças humanas tem sido historicamente negligenciado e foi atribuído principalmente às funções digestivas e absorptivas; no entanto, nas últimas duas décadas, descobertas relacionadas à nutrição humana e à interação recíproca entre microbiota intestinal e hospedeiro estabeleceram papel essencial na saúde intestinal, na patogênese de doenças crônicas e no bem-estar geral (DEY *et al.*, 2021).

A microbiota intestinal não é apenas um observador inerte, mas também afeta dinamicamente diferentes funções do organismo, como metabolismo, resposta nutricional, ritmicidade circadiana e imunidade. Além disso, controla diversos processos fisiológicos do hospedeiro que por sua vez, fornece nicho e nutrientes para a sobrevivência dos microrganismos. Portanto, esta interação entre o sistema imunológico e a microbiota é essencial para a homeostase intestinal (DEY *et al.*, 2021).

Os microrganismos apresentam funções variadas em diferentes partes do intestino como participação do metabolismo de vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos de cadeia curta, regulação do estado fisiológico do corpo, entre outros. No entanto, além do TGI, esta comunidade composta por trilhões de microrganismos habita praticamente todo o corpo humano e influencia positivamente em diversos aspectos da fisiologia humana (THAISS *et al.*, 2014; ATARASHI *et al.*, 2017). Ao contrário, mudanças no ecossistema da microbiota saudável podem afetar o estado de saúde do indivíduo de maneira negativa, por isso é crucial ter uma compreensão completa da relação bidirecional entre a microbiota e a fisiologia do hospedeiro, fornecendo uma visão precisa de como a microbiota pode ser aproveitada como forma preventiva ou terapêutica para várias doenças (HARACH *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que o desenvolvimento da microbiota intestinal ocorre no início da vida e está relacionado a diversos fatores, entre os quais, os mais importantes são a via de parto e o método de alimentação durante a infância (STEWART *et al.*, 2018; AL-RASHIDI, 2021). No entanto, a colonização da microbiota intestinal continua até a vida adulta, sendo relacionada com a capacidade de aderência das bactérias nos receptores de adesão da mucosa intestinal. Além disso, fatores como idade, sexo, genética, sistema imunológico e estado de saúde ou doença do hospedeiro, uso de medicamentos terapêuticos, localização geográfica, fatores socioeconômicos, como condições de moradia e sanitárias também contribuem para este processo (AL-RASHIDI, 2021). Após completar essa colonização, o trato gastrointestinal passa a abrigar uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, variando quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente (MORAES *et al.*, 2014).

A alimentação do indivíduo constitui um fator determinante das características da colonização intestinal, desde o período de amamentação até a fase de envelhecimento (MORAES *et al.*, 2014). A dieta ocidental caracterizada pelo elevado consumo de gordura, sal, aditivos alimentares e baixo teor de fibras é um dos principais fatores que contribuem com a maior proliferação de bactérias patogênicas na microbiota intestinal (JUMPERTZ *et al.*, 2011; CHRIST *et al.*, 2019).

O equilíbrio entre as espécies que constituem a microbiota do hospedeiro denomina-se eubiose. Este estado contribui para melhora da imunidade, digestão e funcionamento do corpo como um todo. Em contrapartida, disbiose são distúrbios que possam influenciar negativamente esta condição, e sua homeostase pode ser reestabelecida por meio de uma alimentação variada rica em probióticos e prebióticos (AL-RASHIDI, 2021).

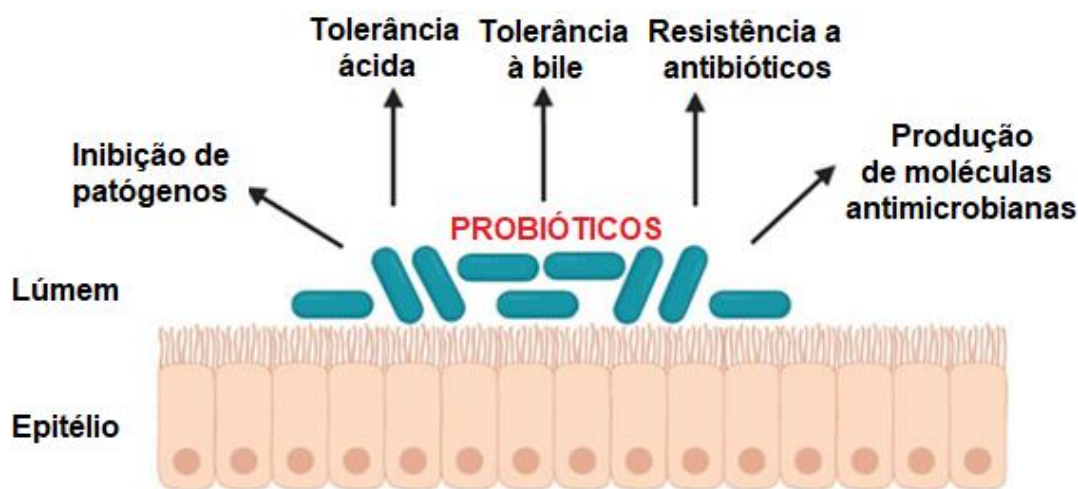
2.2 PROBIÓTICOS E SEUS BENEFÍCIOS A SAÚDE

A palavra probiótico deriva-se da língua grega, e significa "para a vida" (KANDYLIS *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2002), probióticos são organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Quando associados às células do epitélio intestinal, atuam diretamente nas funções de seleção, regulação e absorção de nutrientes no intestino delgado. Quando trabalham junto às células de defesa, contribuem para o reforço do sistema imune, defendendo o organismo de possíveis patógenos presentes nos alimentos causadores de infecções, permitindo o equilíbrio do ambiente intestinal (KUMAR *et al.*, 2016; MAIA *et al.*, 2018).

Outras funções são atribuídas aos probióticos, como auxiliar no metabolismo da lactose, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, melhora da integridade da barreira intestinal resultando na manutenção da tolerância imunológica e diminuição da translocação de bactéria, melhora dos sintomas da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas, diminuição das concentrações de colesterol, efeitos anti-hipertensivos e inibição da mutagenicidade (PAIXÃO & CASTRO, 2016).

Um critério fundamental para a obtenção de probióticos eficazes é a sua capacidade de aderir ao trato gastrointestinal (mucosa intestinal e células epiteliais) e sobreviver as condições adversas do TGI, incluindo resistir a variações de pH (acidez do ambiente gástrico) em quantidade adequada para multiplicar-se, colonizar e modular o sistema imunológico de todo o corpo, suprimindo competitivamente os patógenos. Outros critérios são que não devem ser patogênicos ou causar efeitos colaterais ao hospedeiro (MATHIPA-MDAKANE *et al.*, 2022). Na Figura 1 estão ilustradas características fundamentais para que um probiótico eventualmente colonize e exerça benefícios para a saúde do hospedeiro.

Figura 1 – Ilustração das características desejáveis dos probióticos



Fonte: Adaptado de MATHIPA-MDAKANE *et al.*, 2022.

Acredita-se que os mecanismos através dos quais se explicam estes efeitos envolvem modificações no pH intestinal, competição de patógenos tanto por receptores locais quanto por nutrientes disponíveis, fatores de crescimento, estimulantes imunomoduladores e células produtoras de lactase (AMARA & SHIBL, 2015). Os probióticos também produzem diversas substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que são capazes de inibir bactérias Gram-positivas e negativas (ASHALOU, 2020).

A probioticação é o processo de incorporação de probióticos em um substrato que serve como matriz para o crescimento e viabilidade probiótica (ADEBAYO-TAYO, *et al.*, 2021). No âmbito dos alimentos funcionais, alimentos à base de probióticos são os que apresentam maior e mais rápido crescimento na produção mundial, representando 70% deste mercado (MARKETS & MARKETS, 2020). Este tipo de formulação alimentar deve ser estável durante a vida de prateleira do produto, conter o número de células viáveis para conferir os benefícios esperados e manter as características sensoriais desejadas (COLLADO *et al.*, 2009).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 241, de 26 de julho de 2018 dispõe sobre os requisitos para a comprovação da segurança e dos benefícios

à saúde para uso dos probióticos em alimentos. A literatura recomenda que os alimentos contenham uma concentração mínima terapêutica de 10^8 e 10^9 UFC/g antes da sua ingestão para garantir que um mínimo terapêutico suficiente de 10^6 e 10^7 UFC/g possa chegar ao cólon (NAZZARO *et al.*, 2012). Ao chegar ao intestino, o microrganismo deve se aderir e modular o ambiente estabilizando a microbiota, inibindo ou até mesmo eliminando os patógenos intestinais, fornecendo assim, seus benefícios (SLEATOR & HILL, 2008). Conhecendo o metabolismo e as condições de crescimento é possível determinar de forma mais eficaz o veículo que deve ser incorporado o probiótico (BONGAERTS & SEVERIJNEN, 2016).

2.2.1 Uso de *Lacticaseibacillus rhamnosus* como probiótico

Tradicionalmente as linhagens mais utilizadas como suplementos probióticos são as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, mais recentemente, outras espécies de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, além de outros microrganismos como *Saccharomyces* spp., vem sendo citadas como potenciais probióticos (MATHIPA-MDAKAME & THANTSHA, 2022).

O gênero *Lactobacillus* foi criado em 1901 e se expandiu ao longo dos anos, até abranger 261 espécies. Recentemente Zheng *et al.* (2020) publicaram uma nova classificação taxonômica para o gênero, com o objetivo de melhor agrupar os microrganismos com maior afinidade. Por esta razão *Lactobacillus rhamnosus* passou a ser denominado *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Espécies que apresentam importância comercial, inclusive como ingredientes de formulações alimentares devem substituir a nomenclatura; no entanto, isto ainda não é uma exigência imediata. Ambas as nomenclaturas podem ser utilizadas até a definitiva incorporação da taxonomia atual em regulamento (ANVISA, 2021).

Assim como os demais integrantes do gênero *Lactobacillus*, *L. rhamnosus* é uma bactéria Gram-positiva, com morfologia bacilar, classificada como anaeróbia aerotolerante e pertencente ao grupo de bactérias lácticas (BERNARDEAU *et al.*, 2008). Metabolicamente, a linhagem é classificada por alguns autores como um microrganismo homofermentativo (ou homolático), gerando como produto da fermentação apenas ácido láctico, através da utilização da glicose disponível no meio

como fonte de carbono, produzindo piruvato por meio da glicólise que, posteriormente, é convertido em ácido láctico pela ação da lactato desidrogenase (WANG *et al.*, 2021). No entanto, outros autores descrevem *L. rhamnosus* como uma espécie heterofermentativa (ou heterolática), capaz de originar, além do ácido láctico, outros produtos na fermentação como ácido acético, etanol e CO₂, (COSTA, 2006; BURITI; SAAD, 2007; FONSECA *et al.*, 2021).

A linhagem foi isolada pela primeira vez do queijo parmesão, e atualmente sabe-se que apresenta a capacidade de colonizar diversos habitats, incluindo matrizes alimentares não lácteas como sucos de fruta (CEAPA *et al.*, 2016; FARIAS *et al.*, 2016; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2019). Devido às suas exigências nutricionais, o cultivo de *L. rhamnosus* é realizado em meio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe), o qual supre suas necessidades metabólicas a uma temperatura ótima de 37°C (CHANG & LIEW, 2013). No entanto, *L. rhamnosus* é capaz de crescer em condições variadas, sendo encontrado em diferentes partes do corpo humano, assim como em vários produtos alimentícios artesanais e industriais (DOUILLARD *et al.*, 2013).

Sunny-Roberts & Knorr (2008) investigaram a capacidade de *L. rhamnosus* VTT E-97800 de sobreviver em estresse osmótico induzido por sacarose e os resultados mostraram que a cepa é capaz de tolerar a sacarose mesmo em concentrações extremas, sugerindo que pode ser usada com segurança em alimentos à base de açúcar. Em outro estudo, Reale *et al.* (2015) investigando a capacidade de *L. rhamnosus* em suportar diferentes fatores de estresse encontrados no processamento de alimentos, verificaram que as cepas eram capazes de crescer em altas concentrações de sal e em temperaturas de 55° C, bem como em temperaturas de congelamento. Alamprese *et al.* (2005), por sua vez, mostraram que *L. rhamnosus* incorporado a sorvete sobreviveu por 30 dias a temperatura de -16° C e até 1 ano a -28 °C.

Tratando-se de sua propriedade de promoção à saúde, estudos demonstram que *L. rhamnosus* pode ser utilizado no tratamento de gastroenterites pediátricas e possui atividade protetora contra infecções promovidas por *Escherichia coli* e outras infecções tanto do trato respiratório quanto do trato gastrointestinal, diminuindo seu tempo de tratamento (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). Acredita-se que seu

potencial de promover a saúde está relacionado principalmente à resistência ao ambiente gástrico ácido, grande capacidade de adesão à camada epitelial do intestino contribuindo com a inibição, crescimento e aderência de bactérias patogênicas, e papel importante na modulação e/ou na estimulação de respostas imune de macrófagos (JORJÃO *et al.*, 2015; FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; MINJ *et al.*, 2020; MATHIPA-MDAKAME & THANTSHA, 2022).

Apesar de *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) ser a linhagem comercial mais utilizada para as finalidades citadas acima, outras linhagens que apresentam grande potencial na geração de produtos funcionais precisam ser melhor investigadas, como é o caso de *L. rhamnosus* ATCC 7469 (LI *et al.*, 2016; FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). Estudos têm buscado demonstrar a aplicabilidade desta linhagem na produção de bebidas vegetarianas ou livres de ingredientes lácteos e recentemente, a linhagem ATCC 7469 foi utilizada para elaboração de produtos à base de suco fermentado de Maracujá da Caatinga (*P. cincinnata*), goiaba (*Psidium guajava* L.) e suco não fermentado de cereja (*Cornus mas* L.), nos quais manteve-se viável durante o estoque variando entre 21 e 28 dias (FARIAS *et al.* 2016; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2019).

No entanto, ainda são necessárias maiores investigações a cerca desta linhagem, visto o potencial biotecnológico que possui, em especial à aplicabilidade no desenvolvimento de produtos funcionais, sendo assim relevante avaliar aspectos como seu comportamento em condições de estresse inerentes ao sistema gastrointestinal e sua interação com prebióticos, por exemplo, a fim de potencializar seus níveis de sobrevivência.

2.3 ALIMENTOS PROBIÓTICOS DE ORIGEM NÃO LÁCTEA

O segmento de bebidas funcionais é um dos que cresce mais rápido mundialmente. Este crescimento ao longo das últimas décadas é reflexo do interesse do consumidor pela saúde e qualidade de vida, impulsionando a demanda por produtos naturais e ingredientes alimentícios com potenciais efeitos benéficos e da oportunidade de mercado que isso vem criando (LILLO-PÉREZ *et al.*, 2021). Apesar da atual disponibilidade comercial de uma grande variedade de ingredientes para este

tipo de alimentos, esforços adicionais em pesquisa e desenvolvimento são necessários para aumentar sua eficiência e desenvolver novos produtos (LILLO-PÉREZ *et al.*, 2021).

Na América Latina, a classe média em expansão impulsiona o aumento do mercado de probióticos e o Brasil é o país que domina o mercado nesta região, bem como o que apresenta maior crescimento. Apesar do incremento da população geriátrica, a faixa etária atual do consumidor com maior interesse em bebidas probióticas é de 18 a 34 anos. Portanto, acredita-se que ao longo das décadas, à medida que esta população envelhece, estratégias de marketing devem ser melhor direcionadas para este grupo (PANDA *et al.*, 2021)

A fabricação de produtos probióticos é predominantemente derivada de matrizes lácteas, incluindo leites fermentados, iogurtes e queijos, uma vez que os laticínios fornecem um meio de cultura favorável para a viabilidade dos microrganismos. Assim, aproximadamente 78% das vendas anuais de probióticos em todo o mundo correspondem ao mercado de laticínios (KANDYLIS *et al.*, 2016; LILLO-PÉREZ *et al.*, 2021). No entanto, produtos lácteos probióticos não são adequados para certos grupos de consumidores e tem trazido limitações para o seu consumo (ALVES *et al.*, 2016; CORONA *et al.*, 2016).

Mantzourani *et al.*, (2019) mencionaram que 65% da população mundial sofre de intolerância à lactose ou possui algum grau de deficiência na enzima β -galactosidase responsável pela hidrólise da lactose, além de alergias relacionadas ao consumo de leites e derivados ou restrições ao consumo de colesterol presente nestes produtos. Uma forte tendência ao vegetarianismo e veganismo também tem encorajado a pesquisa e o desenvolvimento de produtos probióticos que apresentem matrizes alimentares à base de frutas, legumes e cereais (KANDYLIS *et al.*, 2016; FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2021).

Em 2020, segundo Markets & Markets (2020), a venda mundial de bebidas vegetais foi próxima de 21,4 bilhões de dólares e estima-se um crescimento de aproximadamente 36,7 bilhões de dólares até 2025. Além disso, a demanda por substitutos do leite de origem vegetal aumentou significativamente (60%-70%) em

comparação com os anos anteriores, o que representou um crescimento de 15% (ao ano) entre 2013 e 2018.

Para que uma fonte vegetal seja considerada um bom veículo para linhagens probióticas, sua composição deve favorecer o crescimento e viabilidade dos microrganismos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Sucos de frutas podem constituir um veículo favorável para culturas probióticas por serem substratos ricos em açúcares, compostos antioxidantes, ácido ascórbico, minerais, vitaminas e fibras dietéticas. Além disso, não contêm alérgenos lácteos, são consumidos regularmente pela população e não contêm culturas iniciantes que competem pelos mesmos nutrientes (YOON; WOODAMS & HANG, 2006, FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017).

A viabilidade dos probióticos em sucos de frutas e vegetais depende de vários fatores importantes, como tipo de cepa, nível de oxigênio, pH, componentes antimicrobianos, temperatura e composição do meio de cultura (BARRERA *et al.*, 2019). Outro fator determinante na seleção da fruta para a produção de sucos contendo probióticos são as características sensoriais resultantes do metabolismo microbiano, sendo indicadas principalmente frutas tropicais pelo aroma e sabor que possuem, podendo assim mascarar possíveis sabores desagradáveis (*off-flavours*) (LUCKOW *et al.*, 2006).

Vale lembrar que a dificuldade de adaptação dos microrganismos às condições ácidas de várias frutas pode ser um fator limitante para a utilização de algumas linhagens para a produção dessas bebidas, por isso a sobrevivência do probiótico nos sucos é mais desafiadora em comparação com produtos lácteos (FARIAS *et al.*, 2016; BARRERA *et al.*, 2019).

As linhagens comumente utilizadas na produção de sucos probióticos de origem não láctea incluem espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* (LILLO-PÉREZ *et al.*, 2021). Além disso, os estudos vêm aperfeiçoando a adequação de diversos sucos de frutas como potenciais substratos para o fornecimento de probióticos, uma vez que essas frutas possuem alto valor nutritivo, e colaboram de forma fundamental no bem-estar da saúde humana (ISTRATI *et al.*, 2018). Neste contexto, vários produtos probióticos à base de frutas foram desenvolvidos, incluindo suco de abacaxi com *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *B. lactis* (NGUYEN *et al.* 2019), suco de melancia

com *L. plantarum* (AMANDA & CHOO, 2018), além de outras frutas que vem sendo estudadas como uva, laranja, frutas vermelhas, pêssego, banana, maracujá, manga, e cereja (ISTRATI *et al.*, 2018).

2.4 PECTINA

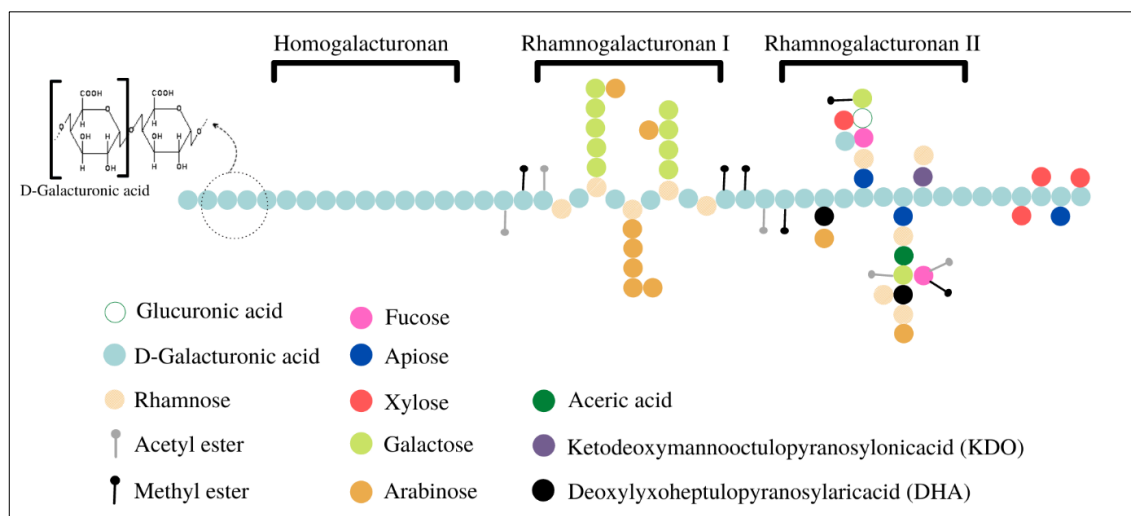
A parede celular de vegetais é composta por diversos tipos de carboidratos dos mais simples aos mais complexos, entre os quais as enzimas do corpo humano não são capazes de metabolizar. Entretanto, bactérias intestinais desempenham esta função de forma eficiente, através de enzimas que auxiliam na degradação destes componentes (LOMBARD *et al.*, 2014).

A pectina, provavelmente a mais complexa macromolécula natural, é um polímero do grupo das fibras dietéticas, amplamente utilizado na indústria de alimentos e constitui um dos principais componentes estruturais da parede celular das plantas (NAQASH *et al.*, 2017). Exerce influência sobre a textura dos alimentos devido às suas propriedades gelificantes, espessantes e estabilizantes, o que favorece a sua aplicação na geração de diversos produtos como geleias, polpa de fruta, produtos cárneos, produtos de panificação, produtos lácteos, bebidas, compotas, doces e confeitos (SANTOS *et al.*, 2015).

Sua estrutura é basicamente composta por unidades de ácido galacturônico e é considerada um heteropolissacarídeo, pois é composta de monossacarídeos diferentes, em algumas regiões, contendo mais de 20 tipos de ligações distintas (Figura 2) (CHRISTIAENS *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2017).

É importante destacar que a estrutura das pectinas pode variar de acordo com a espécie vegetal, com o tecido vegetal e com as partes do fruto (CHRISTIAENS *et al.*, 2016). Geralmente, o que diferencia um conteúdo de pectina do outro é a composição dos açúcares, comprimento da cadeia e grau de esterificação (GE), sendo este o meio mais utilizado para classificação das substâncias pécticas, pois reflete o nível de carboxilas esterificadas presentes em sua estrutura e correlaciona-se com a propriedade de formação do gel, o qual define sua adequação no uso na indústria (CELUS *et al.*, 2018).

Figura 2 – Esquema ilustrativo da estrutura molecular da pectina.



Fonte: Santos, Mendes & Ribeiro, 2022

Pectinas comerciais podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o percentual de metoxilação, ou seja, com o GE. Quando esse grau é superior a 50% a pectina é classificada como de alta metoxilação (AM) (ou alto grau de esterificação); e quando inferior a 50% é definida como de baixa metoxilação (BM) (ou baixo grau de esterificação). A pectina BM, por possuir um maior número de carboxilas livres, não metoxiladas carregadas negativamente, possui uma densidade de carga elevada quando comparada com a pectina AM (CELUS *et al.*, 2018; CELUS *et al.*, 2017). Sendo assim, pectinas com GE > 50% necessitam da presença de açúcar e pH ácido (2,0 – 3,5) para formação do gel. Por sua vez, pectinas com GE < 50% carecem da presença de íons de cálcio, são independentes da presença de açúcares e podem atuar em uma maior faixa de pH (2,0 – 7,0) (YAPO, 2009).

A gelificação, característica conferida pela pectina, é baseada, além da sua estrutura em si, na ligação da molécula a cátions bivalentes, principalmente Ca^{2+} . Essa propriedade envolve a formação de dímeros de pectina através de ligações entre as carboxilas, negativamente carregadas, com os cátions Ca^{2+} , que conferem uma estrutura de rede (CELUS *et al.*, 2018). Além dessa propriedade, a pectina possui capacidade antioxidante lipídica, também conferida pela associação a cátions, sendo,

nesse caso, ligações com íons Fe^{2+} , o qual possui função de oxidante lipídico em produtos alimentícios (CELUS *et al.*, 2018). A associação desse carboidrato não digerível a íons como Fe^{2+} e Zn^{2+} já foi relatada por conferir uma menor bioacessibilidade, já que estes minerais podem não ser liberados durante a digestão, não disponibilizando a absorção pelo intestino delgado (RAES, KNOCKAERT, STRUIJS, & VAN CAMP, 2014).

No cólon, a pectina pode ser fermentada pela microbiota presente, gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais são benéficos ao organismo humano. A fermentação desses biopolímeros favorece a permanência de bactérias benéficas no intestino. No entanto, a depender da estrutura, as características da fermentação podem ser alteradas. Pectinas com baixa metoxilação são fermentadas mais eficientemente, e consequentemente produzem uma quantidade maior de AGCC (TIAN *et al.*, 2016).

Cascas de frutas cítricas e o bagaço da maçã são os principais materiais utilizados na extração para a produção de pectinas de alto grau de esterificação, comercialmente aceitáveis (KOUBALA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2015). O teor em substâncias pécicas varia de acordo com a origem botânica do produto vegetal, podendo ser maior em alguns produtos agrícolas industriais, como polpa de beterraba, bagaço de maçã e albedo cítrico, sendo superior a 15% em base seca (CANTERI *et al.*, 2012). A busca de fontes alternativas e viáveis para obtenção de pectina tem aumentado, assim como o mercado na qual ela está inserida, sendo estimado que até 2025 o crescimento pode chegar a 1.370 milhões de dólares (ABBOUD *et al.*, 2020). Entre as matérias-primas alternativas estudadas para extração de substâncias pécicas podem ser citadas: a casca de manga, o repolho, as cascas de banana, o resíduo de cacau e a casca de maracujá (CHRISTIAENS *et al.*, 2015; FISSORE *et al.*, 2015; SANTOS, AZOUBEL & GOUVEIA 2016; SANTOS *et al.*, 2017).

O método de extração da pectina mais comum em matrizes vegetais é a extração com ácido em temperatura alta por ser uma técnica simples, de fácil acesso e de baixo custo; no entanto, outros tipos de extração têm recebido destaque por ocorrer de forma rápida e eficiente, como por exemplo a extração contínua por campos elétricos pulsados, extração por ultrassom e a extração por micro-ondas (XI *et al.*, 2020). Estas técnicas alternativas, apesar de apresentarem inúmeras vantagens como

menor degradação e perdas, nem sempre estão disponíveis na prática principalmente devido aos custos altos (XI *et al.*, 2020).

2.4.1 Propriedades Prebióticas da Pectina

Como já mencionado, o consumo de uma dieta rica em fibras promove diversos efeitos benéficos à saúde do indivíduo, incluindo a proteção contra a constipação, diverticulose do cólon, carcinoma de intestino grosso e estômago, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (ANDERSON *et al.*, 2019). Para atuarem como prebióticos, as fibras dependem de uma série de fatores, como a estrutura química que as compõem, assim como a capacidade metabólica do microrganismo probiótico. Apesar de ainda serem necessários novos estudos para avaliar a influência de fibras alimentares na microbiota intestinal e os seus benefícios na alimentação, acredita-se que as bactérias evoluem quando submetidas a algum estresse dietético, desenvolvendo a capacidade de metabolizar novas substâncias (RASMUSSEN & HAMAKER, 2017).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, mas fermentados no cólon pelos microrganismos, que possuem a capacidade de modificar a microbiota intestinal de tal forma que a proliferação de bactérias probióticas é estimulada e as atividades bacterianas adversas à saúde do hospedeiro são suprimidas, causando um aumento nos grupos bacterianos que metabolizam a fibra insolúvel e produzem metabólitos como o ácido butírico, que influencia a saúde da mucosa intestinal (MATEOS-APARICIO *et al.*, 2020).

Dentre os prebióticos investigados, as pectinas vêm recebendo destaque. Em seu trabalho, Fissore *et al.* (2015) demonstraram que o baixo grau de esterificação da pectina pode estimular seletivamente o crescimento de linhagens probióticas auxiliando no crescimento de bactérias intestinais benéficas em decorrência da atuação do ácido butírico gerado pela degradação da fibra, que exerce influência positiva na saúde e prevenção da invasão por agentes enteropatogênicos na mucosa. Desta forma, fontes vegetais capazes de disponibilizar pectinas de baixo grau de esterificação, como por exemplo, casca de maracujá, alcachofra e polpa de beterraba,

também apresentam potencial no mercado alimentício, em especial para o desenvolvimento de produtos funcionais (CHRISTIAENS *et al.*, 2015; FISSORE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

Substâncias pécticas apresentam através da sua metabolização, fraca tendência laxativa e estimulam seletivamente o crescimento de bactérias intestinais, promovendo alterações específicas na composição e atividade da microbiota intestinal, exercendo efeitos fisiológicos benéficos sobre a saúde e o bem-estar do organismo, contribuindo para reduzir o risco de doenças intestinais ou sistêmicas e favorecendo o crescimento de microrganismos benéficos como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* sp. (CORZO *et al.*, 2015; GIBSON *et al.*, 2017). Além disso, o ácido butírico produzido influencia positivamente a saúde da mucosa do cólon pela inibição de inflamações e de carcinogênese, incluindo a prevenção de invasão da mucosa por agentes enteropatogênicos (PARKAR *et al.*, 2010; FISSORE *et al.*, 2015).

Estudos relatam que oligossacarídeos pécticos afetam a eficiência da adesão celular de bactérias patogênicas dificultando o estabelecimento de pontos de fixação e ligações múltiplas com as bactérias ao saturar os locais do receptor nas células (GANAN *et al.*, 2010; NAQASH *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudos comprovam que as substâncias pécticas apresentam capacidade de atuar na redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e dos níveis de colesterol total, retardar o esvaziamento gástrico e melhorar a tolerância à glicose (DE FAVERI *et al.*, 2020).

A pectina também é altamente valorizada como um ingrediente alimentar funcional e é encontrada em diversas aplicações farmacêuticas. Estudos relatam a utilização da pectina na formulação de drogas empregadas no tratamento de diabetes, colesterol ou hipertensão arterial sistêmica (GOMEZ *et al.*, 2016; NAQASH *et al.*, 2017). Além disso, a pectina também foi explorada na cicatrização de feridas e engenharia de tecidos (MUNARIN, TANZI, & PETRINI, 2012). Estes relatos enfatizam a relevância que substâncias pécticas possuem na manutenção da saúde humana de diversas formas.

Outro aspecto importante consiste na capacidade das pectinas exercerem influência sobre linhagens probióticas. Estudos *in vitro* demonstraram efeitos positivos da presença de pectina, estimulando o crescimento de gêneros probióticos como

Lactobacillus e *Bifidobacterium* (CHEN *et al.*, 2015), uma vez que a pectina pode ser fermentada pela microbiota presente, gerando AGCC, os quais são benéficos ao organismo humano.

No estudo de Parkar *et al.* (2010), a pectina extraída do kiwi se mostrou eficaz no aumento da adesão de *L. rhamnosus* em comparação com a inulina e atuou na queda da adesão para *Salmonella typhimurium*. Em outra investigação, a pectina contribuiu para o crescimento do *Lactobacillus acidophilus*, além de melhorar a resistência contra condições de estresse (NAZZARO *et al.*, 2012). Khodaei *et al.* (2020) observaram que filmes comestíveis a base de pectina de baixo grau de metoxilação foram capazes de preservar a viabilidade de *L. plantarum* e *L. casei*, quando armazenados a uma temperatura de 4 °C durante 50 dias de estoque. Diante disso, é importante compreender de que forma a pectina pode contribuir para a promoção de mudanças nas características sensoriais dos produtos alimentícios, bem como na manutenção da viabilidade dos probióticos incorporados a estas formulações (FILHO *et al.*, 2019).

2.5 ALIMENTOS SIMBIÓTICOS

O potencial sinérgico entre probióticos e prebióticos resulta em um produto simbiótico que beneficia o hospedeiro devido às mudanças desejáveis na composição e atividade da microbiota gastrointestinal, resultando no aumento da sobrevivência e implantação de células microbianas vivas no intestino do hospedeiro (COSTA *et al.* 2020; TARIFA *et al.* 2022).

O conceito de que uma combinação simbiótica adequada de ambos os componentes em um único produto garantem efeitos superiores quando comparados à atividade do probiótico ou prebiótico sozinho vem se fortalecendo. Inúmeras combinações possíveis são investigadas se mostrando promissoras na modulação da microbiota intestinal em humanos, entre elas diversas espécies de *Lactobacillus* e Bifidobactérias, e como exemplos de prebióticos a inulina e a pectina (WALSH *et al.*, 2014; FREIRE *et al.*, 2017).

Os maracujás de forma geral, por serem frutas de baixo custo e que permitem o aproveitamento de praticamente todos os seus constituintes são excelentes opções para fabricação de bebidas simbióticas. Além disso, o uso do fruto contribui para a preservação do meio ambiente decorrente da diminuição da geração e valorização dos resíduos industriais, visto que a pectina da casca também pode ser aproveitada. Estes motivos encorajam o surgimento de mais investigações acerca da utilização e aplicabilidade do maracujá, sobretudo do maracujá da Caatinga e de seus componentes como ingredientes tecnológicos na indústria alimentar com alto valor nutricional agregado, bem como por ser um fruto nativo de uma região pobre em recursos econômicos, resultando em mais uma fonte de renda para os produtores.

2.6 MARACUJÁ DA CAATINGA

O maracujazeiro pertence à família *Passifloraceae*, a qual é amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas. O Brasil, assim como a Colômbia, Equador e Peru são considerados os principais centros de diversidade para o gênero, por apresentar cerca de 120 espécies em seu território (PEREIRA; CORRÊA; OLIVEIRA, 2015). Sendo assim, nos últimos anos o país tem recebido destaque como o maior produtor mundial de maracujá, totalizando cerca de 60% da produção global, dos quais 90% da produção nacional corresponde ao maracujá amarelo (OLIVEIRA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2021).

De uma maneira geral, o maracujá é bem conhecido como uma fruta rica em vitaminas, principalmente a vitamina C, possui propriedades sedativas, além do seu alto teor de potássio (EMBRAPA, 2016). Por ser rico em nutrientes, os frutos do gênero *Passiflora* apresentam muitos efeitos terapêuticos, como ter ação cicatrizante, anticonvulsivante, anti-inflamatória e ansiolítica (COQUEIRO *et al.*, 2016).

O fruto pode ser utilizado de diversas formas, e seu aproveitamento não é limitado somente ao uso da polpa, pois a casca também pode ser aproveitada na extração da pectina, proporcionando o uso integral do fruto e diminuindo os resíduos resultantes do seu consumo (CANTERI, 2012; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016; FARIAS *et al.* 2016; SANTOS *et al.*, 2017). A casca do maracujá é um subproduto da indústria

do processamento de frutas e representa aproximadamente 50% do peso total do fruto, podendo conter de 60 a 80% de pectina na composição (CORRÊA *et al.*, 2016) e a extração a partir da farinha da casca tem sido proposta por alguns autores constituindo uma alternativa às fontes comerciais de pectina normalmente utilizadas (SANTOS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). Apesar do seu conteúdo tão rico, constituído por vitaminas, minerais, componentes bioativos, como antioxidantes e fibras, a subutilização destas cascas pode representar um importante problema ambiental. Desta forma, este subproduto representa um recurso potencialmente explorável e seu aproveitamento e transformação em compostos de alto valor agregado pode contribuir para a redução do impacto negativo ao meio ambiente (ABBOUD *et al.*, 2020).

Apesar de o gênero *Passiflora* possuir grande biodiversidade nativa de espécies, o cultivo comercial do Brasil está baseado em uma espécie única – maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) (Figura 3) – que domina cerca 95% dos palmares de *Passiflora* existentes no Brasil, sendo cultivada em quase todo o território nacional devido à suas características alimentares, ornamentais, medicinais, qualidade dos seus frutos, produtividade e rendimento em suco (MELETTI & BRUCKNER, 2001; PITA, 2012; CERQUEIRA SILVA *et al.*, 2014). Contudo, existem outras espécies de maracujá com aproveitamento alimentar potencial e que são praticamente desconhecidas do consumidor dos centros urbanos (MENDES *et al.*, 2021).

O Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*) (Figura 4), também conhecido como Maracujá do Mato, é uma planta silvestre popularmente conhecida no semiárido brasileiro, ocorrendo espontaneamente no Nordeste (EMBRAPA, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2019). É uma planta de natureza perene e resistente à seca, sobrevivendo em condições de absoluta estiagem, bem como a uma série de pragas que atingem o maracujá comum (ARAÚJO *et al.*, 2002). A fruta é amplamente conhecida por suas propriedades medicinais, em especial, por ter efeito calmante e relaxante, possui um alto valor nutritivo, é rica em minerais e vitaminas, principalmente vitamina C e muito utilizada na fabricação de sucos devido ao sabor característico (ARAÚJO *et al.*, 2002; EMBRAPA, 2016; JESUS *et al.*, 2017).

Figura 3 – Frutos do Maracujá amarelo (*Passiflora edulis*).



Fonte: Farming, 2017.

Figura 4 – Frutos do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*).



Fonte: Embrapa, 2016.

O aproveitamento do Maracujá da Caatinga é marcado pelo extrativismo e a subsistência, sendo normalmente comercializado no Nordeste na entressafra do Maracujá Amarelo. Muitas famílias do sertão utilizam o maracujá da Caatinga na alimentação, e o excedente é comercializado em feiras locais ou no desenvolvimento de produtos derivados como geleias, licores artesanais entre outros, representando assim uma fonte de renda para os pequenos agricultores, pois exige tecnologia

simples e extensa vida de prateleira, além de ser uma espécie adaptada às condições locais de cultivo (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2010).

A utilização do fruto representa um alvo potencial de ações para o desenvolvimento sustentável da região Semiárida do Brasil, que corresponde a 65% do território do Nordeste, entretanto já se observa escassez do maracujá da Caatinga em algumas regiões do semiárido (ARAÚJO & FALEIRO, 2020). Por esta razão, na tentativa de erradicar estes problemas em 2016, após uma década de estudos, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) lançou a primeira variedade para cultivo comercial denominada BRS Sertão Forte, resultante do cruzamento entre populações da espécie e que suporta um maior estresse hídrico no que diz respeito a limitação de água e promove um maior rendimento de frutos (EMBRAPA, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2019; RINALDI *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de alimentos sustentáveis traz enormes benefícios para o planeta, e adicionalmente representa uma oportunidade de fortalecer a agricultura tradicional, resultando em uma maneira mais eficiente de atender ao abastecimento mundial de alimentos (PIMENTEL *et al.*, 2021). Estudos foram desenvolvidos utilizando bebidas à base do maracujá da Caatinga como meio de cultura para microrganismos probióticos, inclusive kefir, e mostraram um bom veículo para esta finalidade (FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2021). Desta forma, incentivar a utilização e popularização do fruto torna-se uma excelente forma de aumentar a sua produção, bem como estratégias para o fortalecimento da agricultura familiar que contribuem para garantir melhores condições de vida por meio da geração de renda das comunidades produtoras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a viabilidade do processo de produção de bebidas fermentadas e simbióticas do maracujá da Caatinga.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir uma farinha da casca do maracujá da Caatinga;
- Extrair e caracterizar a pectina da farinha da casca do maracujá através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Realizar fermentações do suco do maracujá da Caatinga por *L. rhamnosus* ATCC 7469;
- Produzir bebidas simbióticas fermentadas pela adição da pectina após a fermentação;
- Verificar a influência da adição de diferentes quantidades de sacarose e pectina nas bebidas fermentadas e simbióticas;
- Avaliar e identificar as bebidas simbióticas que apresentam as melhores condições no que diz respeito a manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469, durante o armazenamento, em estoque refrigerado.
- Avaliar parâmetros físico-químicos (pH, concentração de carboidratos e de ácidos orgânicos) das bebidas no início e final do armazenamento;
- Avaliar a sobrevivência do microrganismo sob condições gastrointestinais simuladas na bebida simbiótica, cujas concentrações de pectina e de sacarose promovam melhor manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL

A elaboração dos produtos para análise foi realizada em sua maioria no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos – LabBio (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE). Contou-se também com o suporte do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos - LEEAL (Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE), Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, Departamento de Engenharia Química – DEQ da UFPE e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco) para a realização das demais etapas do estudo.

4.2 MATERIAIS

O Maracujá da Caatinga foi obtido através de doação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, coletados do município de Tapiramutá (WGS84: 11° 50' 49" S, 40° 47' 27" W), Bahia, Brasil.

A linhagem de *L. rhamnosus* ATCC 7469, bem como os demais materiais, incluindo equipamentos, vidrarias, reagentes e outros insumos foram disponibilizados pelos laboratórios onde as análises foram realizadas.

A cultura comercial de *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, USA). A linhagem probiótica foi preservada em glicerol a 10% (v/v) a - 20°C de acordo com Liew *et al.* (2005) e Chang & Liew (2013), no LABBIO – UFPE.

4.3 PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DE *L. RHAMNOSUS* ATCC 7469

A cultura preservada foi inoculada em 25 mL de caldo MRS (Merck, KGaA, Germany) e incubada em estufa (SP-101/216, LABOR) durante 48 h a 37 °C. Posteriormente, 1ml de suspensão celular foi inoculada em Erlenmeyers com MRS-Agar (Merck, Alemanha, KGaA), e incubada por mais 48 h a temperatura de 37°C.

Após crescimento, as células contidas em cada Erlenmeyer foram ressuspensas em glicerol 10% (v/v) sob agitação para que as células desprendessem do meio e o volume total foi agrupado em Erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizado. Alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos eppendorfs, os quais foram armazenados em freezer a -20 °C até o uso.

Para reativação do microrganismo, um volume de 2 mL da suspensão de *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi inoculado em 25 mL do meio MRS e, em seguida, a cultura foi incubada em estufa (SP-101/216, LABOR) a 37°C até o final da fase exponencial de crescimento (aproximadamente 48h).

4.4 OBTENÇÃO DA POLPA DE MARACUJÁ

Os maracujás foram previamente selecionados de acordo com suas características físicas e sensoriais (cor, danos físicos, grau de maturação, qualidade da casca). Os frutos que apresentaram características insatisfatórias, incluindo danos físicos em geral ou indícios de que estavam inadequados para consumo (verde, passado ou podre) foram descartados.

Para obtenção da polpa, os frutos foram selecionados e lavados com água corrente e sabão líquido. A extração da polpa foi realizada utilizando-se uma faca de aço inoxidável para cortar o fruto ao meio e de uma peneira para remoção das sementes. A polpa dos frutos foi homogeneizada, acondicionada em frascos de vidro e armazenada em freezer comum (-20°C), no LabBio, até o momento da utilização.

4.5 OBTENÇÃO DA FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ

A farinha da casca do maracujá da Caatinga foi obtida de acordo com o procedimento descrito por Santos *et al.* (2016). Após a remoção da polpa, as cascas foram cortadas em pequenos pedaços e secas em estufa (NT514, Novatecnica) a 55 °C *overnight* (aproximadamente 16h). Posteriormente, as cascas secas foram trituradas e tamisadas em moinho de faca (Marconi) (Figura 5) no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) a 20 mesh. Da farinha obtida foi calculado o rendimento a partir

das cascas in natura, sendo posteriormente embalada e armazenada em geladeira (4 ± 1 °C) até o momento de sua utilização.

Figura 5 – Moinho de facas utilizado para produção da farinha das cascas dos maracujás.



Fonte: O autor, 2022.

4.6 EXTRAÇÃO DA PECTINA DA CASCA DO MARACUJÁ

A pectina foi obtida através da extração realizada a partir da farinha da casca do maracujá utilizando o ácido cítrico, segundo metodologia proposta por Santos *et al.* (2017) com modificações. Foram pesados em triplicata 2,5 g da farinha da casca do maracujá em frasco de Erlenmeyer de 250 mL e adicionados 125 mL de ácido cítrico 0,75 M. Em seguida, o frasco foi acondicionado em incubador rotativo (Tecnal, TE-422) a 50°C e 150 rpm, durante 2 horas. Após a extração, a suspensão, ainda quente, foi filtrada utilizando papel de filtro qualitativo com 12,5 cm de diâmetro. O filtrado foi arrefecido em geladeira (4 ± 1 °C) durante 24 horas e, posteriormente, o mesmo foi submetido ao processo de coagulação durante 1 hora, pela adição de etanol a 96% (v/v). O material oriundo da coagulação foi separado em peneira fina e posteriormente lavado três vezes, primeiramente com 15 mL de etanol 70% (v/v) e 0,5% (v/v) de HCl, em seguida com 15mL de etanol 70% (v/v) para neutralizar o pH e, finalmente, com 15 mL de etanol a 96% (v/v). O material resultante foi submetido ao processo de secagem (em estufa a 50°C durante 4 horas). Este processo foi repetido

diversas vezes até obtenção de uma quantidade suficiente de pectina para as análises.

O rendimento da pectina extraída do maracujá foi determinado de acordo com a Equação (1), onde “M” corresponde a massa seca do material extraído (em gramas) e “FC” a massa seca inicial da farinha da casca do maracujá (em gramas).

$$Y = \left(\frac{M}{FC} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

4.7 GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DA PECTINA

Foi determinado através de titulação potenciométrica (Bochek *et al.*, 2001). Para isso, foram pesados 0,2 g de pectina (base seca) em triplicata, umedecidas em recipiente com 1 mL de etanol (96 % v/v). Em seguida, a mistura foi diluída pela adição de 20 mL de água destilada a 40°C sob agitação (100 rpm) em incubador rotativo, durante 2 horas. A solução resultante foi titulada com NaOH (0,1 M) na presença de fenolftaleína até atingir coloração rósea, quando o pH atingiu valores entre 8,0 – 8,2. Posteriormente, foi calculado o número de carboxilas livres em porcentagem (Kf) através da Equação (2), sendo considerados 0,045 como valor que corresponde à massa molar do grupo carboxila para um litro e a (denominador da Equação 2) como a porção ponderada entre pectina e água (g).

$$Kf (\%) = \frac{M_{NaOH} \left(\frac{mol}{l} \right) V_{NaOH(L)} \times 0,045 \left(\frac{g}{mol} \right)}{a (g)} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Posteriormente foi realizada a determinação dos grupos carboxilas esterificadas (Ke). Para isso, foram adicionados 10 mL de NaOH (0,1 M) para neutralizar os ácidos poligalacturônicos após determinação dos grupos carboxilas livres. Posteriormente a amostra foi agitada (100 rpm) por mais 2 horas (29 °C) para garantir a total saponificação dos grupos carboxila esterificados. Foram colocados 10 mL de HCl (0,1 M) e o excesso do ácido foi neutralizado com NaOH (0,1 M). O número de grupos esterificados foi calculado através do volume gasto de NaOH (0,1 M) pela Equação (3):

$$Ke (\%) = \frac{MNaOH\left(\frac{mol}{l}\right)VNaOH(L) \times 0,045\left(\frac{g}{mol}\right)}{a (g)} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Por fim, foi determinado o número total (Kt) de grupos COOH, resultante da soma dos grupamentos livres e esterificados ($Kt = Ke + Kf$), e em seguida foi determinado o grau de esterificação (GE) em porcentagem através da Equação (4):

$$GE (\%) = \left(\frac{Ke}{Kt}\right) \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

4.8 CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

O espectro de RMN de 1H foi realizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Departamento de Química Fundamental da UFPE) segundo metodologia descrita por Taboada *et al.* (2010) com alterações, na tentativa de caracterizar a pectina. Foram preparadas duas amostras, sendo uma amostra controle com pectina comercial (Amostra 1) e outra com pectina do maracujá da Caatinga (Amostra 2). As amostras foram preparadas utilizando 20 mg de pectina diluída em 1 mL de água deuterada (D_2O , Cambridge Isotope Laboratories).

O espectro de RMN foi obtido no espectrômetro Agilent, com a frequência de ressonância do 1H em 400 MHz, a uma temperatura de 27°C, em um tubo de RMN de 5 mm, utilizando-se a sequência de pulsos *presat*, para saturação do sinal residual da água.

4.9 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ DA CAATINGA

A composição centesimal da farinha da casca do MC foi determinada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos – LEEAL, os constituintes determinados foram umidade, cinzas, proteínas, carboidratos e lipídios, sendo todos eles analisados em triplicata.

A umidade foi determinada através do aquecimento direto da amostra em estufa a 105°C até peso constante. Cinzas foram quantificadas através do aquecimento em mufla a 550°C até incineração (ADOLFO LUTZ, 2008).

A quantificação das proteínas da amostra foi realizada através do método de Kjeldahl, baseado na determinação da matéria nitrogenada total da amostra, transformando-o em sulfato de amônio por meio de H₂SO₄, seguindo as etapas de digestão, destilação e titulação (ADOLFO LUTZ, 2008).

Lipídios foram determinados através do método em Soxhlet, através de uma extração contínua, onde são lavados repetidamente com solvente orgânico, neste caso o éter etílico, seguido de remoção por evaporação ou destilação do solvente (ADOLFO LUTZ, 2008).

Os hidratos de carbono foram determinados através do resultado da soma de todos os constituintes determinados e posterior subtração do peso total (100g) (OSCAR, 1995), enquanto o Valor Calórico Total (VCT), calculado levando em consideração a quantidade de calorias presente por grama de cada constituinte (1g de proteínas – 4 calorias, 1g de carboidrato – 4 calorias, 1g de lipídio – 9 calorias).

4.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Para determinação das melhores condições em relação à sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 após 28 dias de estoque, foi aplicado DCCR com três replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios. As duas variáveis estudadas foram as concentrações de sacarose e pectina, designadas como x_1 e x_2 respectivamente.

Os níveis foram determinados com base no estudo de Santos *et al.* (2017), e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Fatores e níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Sacarose (%)	3	5	10	15	17
Pectina (g/L)	2	5	12,5	20	23

4.11 PRODUÇÃO DAS BEBIDAS SIMBIÓTICAS

4.11.1 Meio de cultura

O meio de cultura para *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi preparado pela diluição da polpa do maracujá da Caatinga 50% (v/v) em água destilada. O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,2$ com NaOH (2 M) utilizando um potenciômetro (P62000, Gehaka). Em seguida, foi realizada a pasteurização em banho maria (TE-084, Pyrotec) durante 35 minutos a 67 ± 2 °C, com posterior resfriamento em banho com gelo (FARIAS *et al.*, 2016).

4.11.2 Produção de bebidas simbióticas

Inicialmente o microrganismo probiótico foi reativado como descrito no item 4.3, e um inóculo de 10% v/v (SANTOS *et al.*, 2017) foi transferido para os frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 45 mL do meio de cultura dos sucos de maracujá (item 4.11.1), resultando em um volume de 50 mL. Os frascos de Erlenmeyer foram acondicionados em estufa (SP-101/216, LABOR) 37°C para a fermentação. Após 24 horas foram adicionadas pectina e sacarose de acordo com as condições descritas na Tabela 2, cujos ensaios foram determinados de acordo com o DCCR descrito no item 4.10.

Tabela 2 – Matriz do planejamento para elaboração das bebidas. Sendo x_1 e x_2 os valores codificados de sacarose e pectina respectivamente.

Ensaio	x_1	x_2	Sacarose (%)	Pectina (g/L)
E1	-1	-1	5	5
E2	+1	-1	15	5
E3	-1	+1	5	20
E4	+1	+1	15	20
E5	0	0	10	12,5
E6	0	0	10	12,5
E7	0	0	10	12,5
E8	-1,41	0	3	12,5
E9	+1,41	0	17	12,5
E10	0	-1,41	10	2
E11	0	+1,41	10	23

As amostras retiradas de cada ensaio foram utilizadas na determinação de pH, viabilidade celular, ácidos orgânicos (málico, cítrico e láctico) e açúcares redutores totais. Este momento foi estabelecido como o início do estoque (T=0 dias). As bebidas foram acondicionadas em geladeira a 4°C para a avaliação do estoque refrigerado após 28 dias.

No final do estoque, as bebidas foram novamente avaliadas para a investigação das concentrações de sacarose e pectina ideais, que promoveram a maior sobrevivência de *L. rhamnosus*. Estas bebidas foram submetidas ao teste de simulação gastrointestinal (Item 4.15) para avaliar a tolerância do microrganismo às condições adversas.

4.12 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.12.1 Determinação do pH

Para determinação de pH, bem como para ajuste do pH das bebidas foi utilizado um potenciômetro digital (P62000, Gehaka).

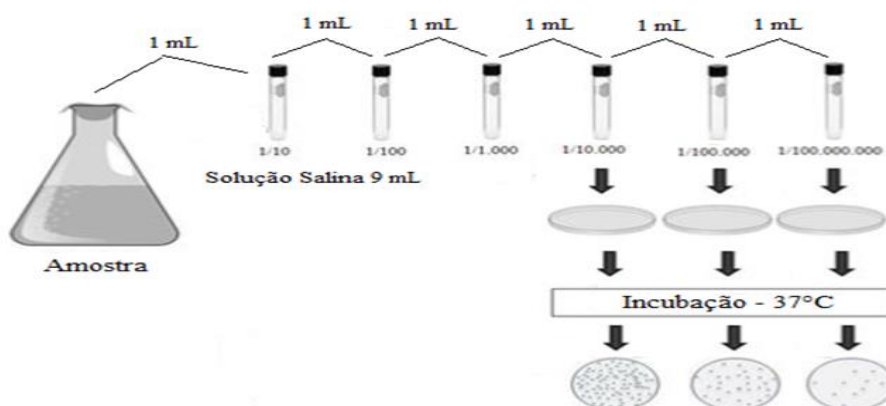
4.12.2 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade da casca da farinha da casca do maracujá e da pectina extraída, foi utilizado um analisador de umidade (MOC63u, Shymadzu), sempre respeitando o peso mínimo de 0,02g de amostra para realizar a análise.

4.12.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular, expressa em Unidades Formadoras de Colônia por mililitros (UFC/mL) foi determinada após a realização de diluições seriadas, em solução salina (0,9 % m/v NaCl) e técnica de espalhamento em placas de Petri, em meio MRS contendo 20 g/L de ágar. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa para cultura bacteriológica (SP-101/216, LABOR) a 37°C durante 48 horas, antes da contagem das unidades formadoras de colônias (Figura 6).

Figura 6 – Esquema ilustrativo da determinação da viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469.



Fonte: O autor, 2022.

4.13 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

As concentrações dos ácidos orgânicos foram determinadas no início e ao final do estoque de 28 dias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema equipado com uma bomba quaternária acoplada com um degaseificador (DGU-20A5r), um forno para controlar a temperatura da coluna, em torno de 28°C, um injetor automático e um detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A). O software utilizado para aquisição de dados foi LC Solution, fabricado por Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). Uma coluna de troca iônica de 300 mm x 7,8 mm (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, EUA), com 9 µm de tamanho de partículas, foi utilizada. Um sistema de eluição isocrática foi aplicado para a fase móvel (H₂SO₄ a 5 mM) com fluxo de 0,6 mL/min.

4.14 DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATOS

4.14.1 Glicose e Frutose

Os carboidratos (glicose e frutose) foram determinados utilizando um sistema semelhante ao descrito no item 4.13, com um detector por índice de refração (IR). A temperatura foi de 60°C, utilizando a mesma coluna cromatográfica, composição e sistema de eluição de fase móvel usados na determinação dos ácidos. As condições da corrida foram de aproximadamente 12 minutos com uma vazão da fase móvel também igual a 0,6 mL/min. As amostras foram diluídas em fase móvel e filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,2 µm.

4.14.2 Açúcares redutores totais

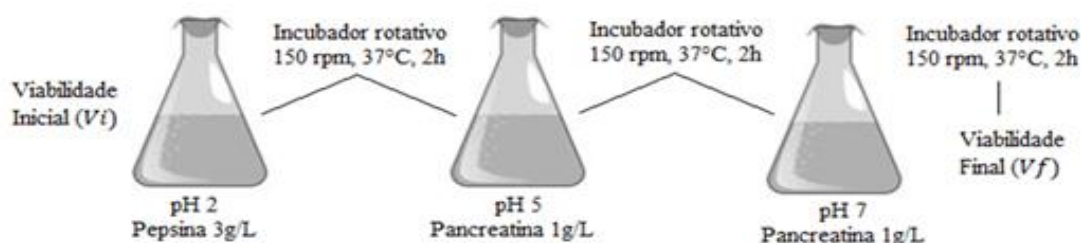
Com relação à determinação dos açúcares redutores totais foi utilizado o método colorimétrico proposto por Miller (1959). Para determinação da concentração, 1 mL da amostra da bebida foi adicionado em um tubo de ensaio e as moléculas de sacarose presentes foram hidrolisadas com 1 mL de HCl concentrado 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. Em seguida, 0,5 mL dessa solução foi adicionado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNSA). A mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e depois resfriada em banho

de gelo. Por fim, foram adicionados 20 mL de água destilada à solução e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (VIS-2006, Gehaka) a 540 nm. A concentração foi determinada utilizando uma curva de calibração com soluções padrão de glicose.

4.15 SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

A simulação das condições gástricas e intestinais de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nas bebidas de maracujá, adicionadas ou não de pectina, seguiu o procedimento descrito por Charteris *et al.* (1998). Através deste, foi avaliada a tolerância do microrganismo por meio da determinação de sua viabilidade e dos índices de sobrevivência (%). A ilustração do procedimento está descrita na Figura 7.

Figura 7 – Esquema ilustrativo do teste de simulação gastrointestinal para verificação da sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nas bebidas simbióticas.



Fonte: O autor, 2022.

O volume utilizado para avaliação foi de aproximadamente 30 mL da amostra, acondicionado em Erlenmeyer estéril de 250 mL. Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para 2,0 com solução de HCl (5,0 M), além da adição de uma quantidade equivalente a 3 g/L de pepsina (Dinâmica, SP, Brasil). O frasco contendo esta mistura foi acondicionado em incubador rotativo a 150 rpm e 37°C, por 2 horas.

Após este período, o pH foi ajustado para 5,0 com solução alcalina (NaOH e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Em seguida, foi adicionada a pancreatina na concentração 1g/L, para que assim o frasco fosse novamente acondicionado em incubador rotativo, nas mesmas condições de temperatura e agitação da etapa anterior.

Após um novo período de 2 horas, o pH foi novamente ajustado, desta vez para 7,0 com a mesma solução salina, e a concentração de pancreatina foi reajustada novamente, para 1 g/L.

No início da fase gástrica (V_i) e no final da fase entérica (V_f) foram determinadas as viabilidades de *L. rhamnosus* ATCC 7469, as quais serviram para calcular a sobrevivência (S) do microrganismo nas condições de simulação gastrointestinal, a partir da Equação (5):

$$S(\%) = \frac{V_i}{V_f} \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

4.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

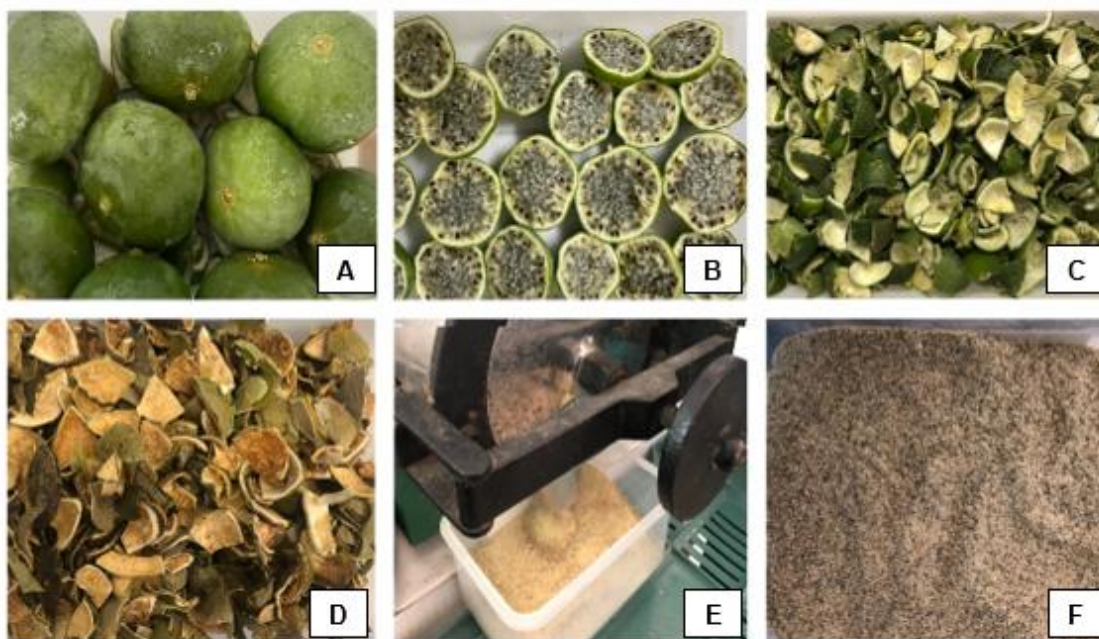
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statisc 7.0, levando em consideração os valores médios das duplicatas experimentais utilizando o teste de variância (ANOVA) e considerando o nível de significância de 5 % ($p \leq 0.05$).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 APROVEITAMENTO DA CASCA DO MARACUJÁ DA CAATINGA

Na presente investigação foram obtidos 146,7g de farinha a partir de 872g de casca *in natura* (umidade 88,8%), o que corresponde a um aproveitamento de 16,8%. As etapas de obtenção da farinha estão ilustradas na Figura 8. Após a secagem, verificou-se que a umidade da casca foi de 5,67% e depois das cascas trituradas e tamisadas a farinha apresentou umidade de 5,81%, estando em conformidade com os padrões da ANVISA descritos na RDC Nº 263 de 22 de setembro de 2005, que dispõe sobre o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, permitindo uma umidade máxima de 15% (g/100g) para farinhas.

Figura 8 – Fases da obtenção da farinha da casca do maracujá da Caatinga.



A – Frutas *in natura* após higienizadas; B – Frutas cortadas; C – Cascas cortadas; D – Cascas secas; E – Moagem da casca; F – Farinha da casca do maracujá da Caatinga.

Fonte: O autor, 2022.

A utilização da casca do maracujá, sobretudo do maracujá amarelo, para fabricação de farinha já é bem estabelecida por ser um subproduto rico em fibras, principalmente solúveis (DE FAVERI *et al.*, 2020). Por serem frutos semelhantes,

acredita-se que estes benefícios podem ser extrapolados para a farinha do maracujá da Caatinga. Desta forma, a utilização deste subproduto seja para consumo *in natura* adicionado a preparações ou na fabricação de produtos funcionais, valoriza o fruto, diversifica seu consumo e minimiza possíveis problemas ambientais decorrentes da grande quantidade de resíduos gerados, uma vez que aproximadamente 50% do peso do fruto é proveniente de sua casca (ABBOUD *et al.*, 2020).

Na Tabela 3 foi descrita a composição centesimal da farinha da casca do MC. Proteínas e gorduras apresentaram baixas frações, como esperado na maioria das frutas. Outros autores relataram a composição da farinha da casca do maracujá amarelo com cerca de 10% de umidade, 7,5% de cinzas, 4% de proteína, 19% de fibra solúvel, 38% de fibra insolúvel e 21% de carboidratos solúveis (CÓRDOVA *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2008).

Os carboidratos corresponderam a maior fração de macronutrientes presentes na farinha, resultados que corroboram com os encontrados por Fonseca *et al.* (2022), que observaram na casca do maracujá roxo (*Passiflora edulis* f. *edulis*) uma proporção de 80,7% de carboidratos, dos quais 76,4% eram fibras.

Tabela 3 – Composição centesimal da farinha da casca do MC.

Constituinte	Farinha da casca MC
Umidade (%)	5,8
Cinzas (g/100g)	6,1
Proteínas (g/100g)	7,2
Gorduras (g/100g)	4,5
Carboidratos (g/100g)	77,3
VCT (Kcal/100g)	378,9

O consumo de fibras alimentares é considerado benéfico para o controle de peso e saúde intestinal, prevenindo constipação e hemorroidas (RAMAIYA *et al.*, 2018), e apesar do VCT relativamente alto para 100g de farinha, deve-se considerar que esta é uma quantidade alta para consumo diário. Ramos *et al.* (2007), observaram em seu

estudo uma redução nos níveis de colesterol total e LDL de mulheres com hipercolesterolemia, utilizando a suplementação com a farinha da casca do maracujá amarelo na dose diária de 30g por dois meses.

No estudo de Marques *et al.* (2016), 36 pacientes com lipodistrofia do HIV foram orientados a consumir 10g de farinha da casca do maracujá amarelo três vezes ao dia e após 30 dias, houve redução média da glicemia, triglicerídeos, colesterol total e LDL de 5,2; 15,0; 18,2 e 19,0%, respectivamente.

Outro estudo demonstrou que a dieta suplementada com farinha da casca do maracujá foi capaz de melhorar parâmetros metabólicos, incluindo redução da glicemia de jejum e hemoglobina glicada em indivíduos com diabetes tipo 2 (DE QUEIROZ *et al.*, 2012).

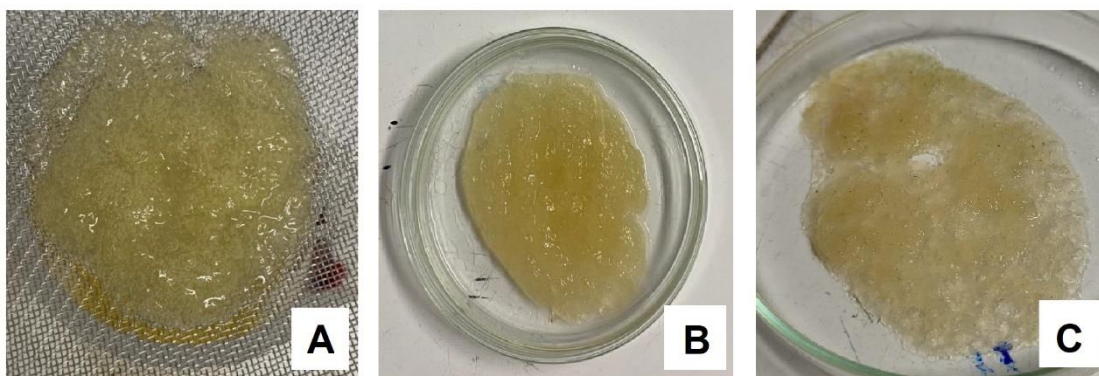
Na investigação de Lima *et al.* (2016), a ingestão de farinha da casca melhorou a sensibilidade à insulina em ratos alimentados com dieta rica em gorduras, bem como foi capaz de modular a resposta da adiponectina e da leptina. Grande parte destes benefícios são atribuídos à pectina presente na casca dos frutos, principalmente por suas propriedades prebióticas e pelo efeito modulador da microbiota intestinal, além de efeitos positivos na diminuição do peso corporal, diminuição de gordura no fígado, melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. (GOMEZ *et al.*, 2016; NAQASH *et al.*, 2017; DE FAVERI *et al.*, 2020).

5.2 RENDIMENTO DA PECTINA OBTIDA DA FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ DA CAATINGA

O rendimento da pectina obtida através da farinha do maracujá da Caatinga (MC) evidenciado no presente estudo foi de aproximadamente 70,4% ($\pm 2,4$). A figura 9 ilustra a pectina extraída antes e depois da secagem. O pericarpo do maracujá representa 60% da fruta fresca, nele estão contidas diversas substâncias bioativas e polissacarídeos, cujo teor de pectina é de 15 a 20 g/100 g (base seca) (FREITAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Tendo em vista o bom rendimento obtido, para preparar 1 litro de bebidas simbióticas em cada uma das condições do presente estudo, cujas concentrações de pectina foram de 2; 5; 12,5; 20 e 23 g/L, seriam necessárias 2,8; 7;

17,5; 27,7 e 32,6g de farinha respectivamente, ou seja, quantidades relativamente pequenas tendo em vista o possível benefício agregado ao produto final.

Figura 9 – Pectina extraída da farinha da casca do maracujá da Caatinga.



A – Durante a extração (lavagem), B – Após extração, C – Depois da secagem.

Fonte: O autor, 2022.

O método de obtenção e o cuidado durante a técnica é de extrema importância para maximizar o rendimento da extração, por isso estudos relacionados à pectina da casca do maracujá com foco principalmente nos efeitos dos extratores e condições de extração no rendimento, propriedades físico-químicas e comportamento do processo da pectina vem sendo desenvolvidos (FREITAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; MARIC *et al.*, 2018).

Segundo Canteri *et al.*, (2012), o teor de substâncias pécticas varia de acordo com a origem botânica do produto vegetal, além de fatores como o agente extrator, temperatura e tipo de energia utilizada para extração. Santos *et al.* (2017) obtiveram um rendimento de 55% em condições semelhantes de extração. Este aumento no rendimento pode ser atribuído às modificações na metodologia, pois ao realizar testes prévios observou-se que parte da pectina após a filtração em gaze, como realizado por Santos *et al.*, (2017), permaneceu retida nas tramas do tecido, por esta razão optou-se por utilizar peneira fina (diâmetro do furo de 1 mm). Estes fatores podem ter contribuído nesta diferença de rendimento mesmo em se tratando de frutos semelhantes. Seixas *et al.* (2014) encontraram um rendimento de 30,3% a partir da farinha da casca do maracujá amarelo utilizando ácido tartárico e micro-ondas.

Oliveira *et al.* (2016) também utilizando o maracujá amarelo observaram um rendimento ainda menor (12,67%), utilizando ultrassom e ácido nítrico.

Além do maracujá, outras matrizes alimentares vêm sendo estudadas como alternativa para a extração de pectina a partir de rejeitos industriais, como casca e bagaço de outras frutas, as quais geralmente são descartadas juntamente com os atributos nutricionais que possuem, como por exemplo, bagaço de uva (32,3%) (MINJARES-FUENTES *et al.*, 2014), casca de laranja (26,74%) (XU *et al.*, 2014) e casca de romã (23,87%) (MOORTHY *et al.*, 2015). A partir destes dados, observamos que apesar de pouco aproveitado, o MC apresenta grande potencial de utilização, levando em consideração o rendimento superior quando comparado aos estudos realizados em outros frutos mencionados acima.

O Grau de esterificação (GE) é um fator determinante na estrutura da pectina pois correlaciona-se diretamente com a capacidade de formação do gel. Liew *et al.* (2014) mencionaram variações de GE de 41,67 a 67,31% em pectinas extraídas do maracujá, cujos fatores interferentes seriam o tipo de casca da fruta e métodos de extração. No estudo de Lin *et al.* (2021), cuja extração da pectina do maracujá ocorreu através de cisalhamento de alta velocidade em baixa temperatura, os GE obtidos foram superiores a 50%. O GE evidenciado neste trabalho foi 19% ($\pm 0,6$), sendo classificado como baixo, assim como no estudo de Santos *et al.* (2017) cujo GE observado no MC foi de 14% podendo esta, ser uma tendência desta espécie de maracujá.

Estudos vem demonstrando que o baixo GE pode proporcionar efeitos benéficos diversos quando comparado ao alto GE, principalmente no que diz respeito à modulação da microbiota. Fissore *et al.* (2015) relataram que pectinas com baixo GE podem estimular seletivamente o crescimento de linhagens probióticas, auxiliando no crescimento de bactérias intestinais benéficas devido ao menor grau de metoxilação, contribuindo para uma maior formação de AGGC. Tian *et al.*, (2016) avaliaram em ratos a influência de quatro tipos de dietas adicionadas de pectina e observaram que a dieta com pectina de baixo GE (29%) foi fermentada de forma mais rápida e eficiente, como consequência, produziram uma quantidade maior de AGCC, além de estimular mais fortemente o crescimento de *Lactobacillus* quando comparada à dieta adicionada de pectina com alto GE.

Estudos relacionando a ação da pectina sobre a viabilidade de bactérias são extremamente importantes, pois auxiliam no desenvolvimento de alimentos funcionais com atributos mais interessantes, considerando por exemplo, o uso de um prebiótico como a pectina, que agrega maior valor nutricional a formulações alimentares probióticas, resultando em produtos simbióticos.

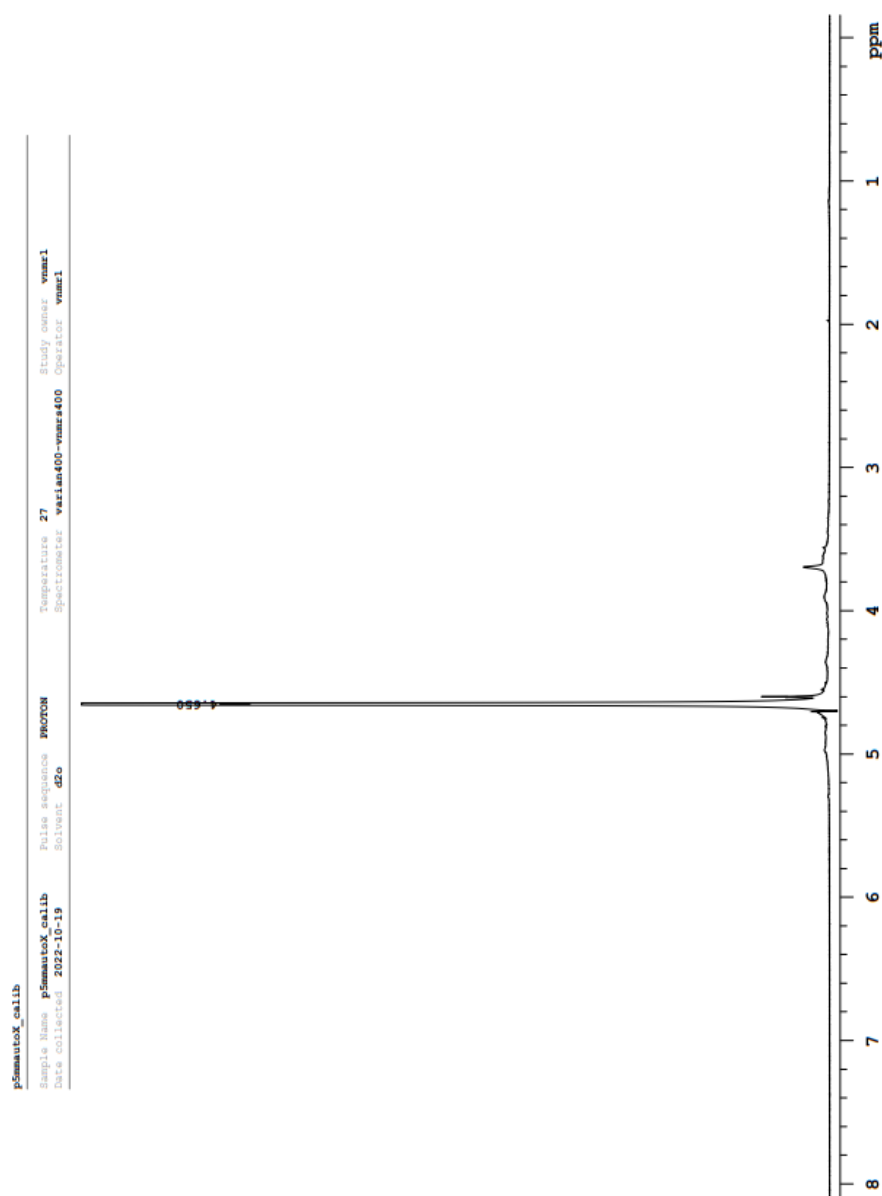
Além da viabilidade outros benefícios são atribuídos a pectina são descritos na literatura como mencionado por Nazzaro *et al.* (2012) que demonstraram que a pectina promoveu uma maior resistência às células de *Lactobacillus acidophilus* frente ao estresse provocado pela acidez gástrica, em decorrência de alterações no perfil proteico celular e pela produção de butirato de sódio, derivado do ácido butírico, capaz de atuar na regeneração da mucosa intestinal e regular a diferenciação celular. Prandi *et al.* (2018) relataram que a pectina da polpa de beterraba contribuiu na supressão de bactérias patogênicas e crescimento de bactérias lácticas. Por fim, Khodaei *et al.* (2020) mencionaram que filmes a base de pectina foram capazes de conferir proteção às células de *L. plantarum*, *L. casei* e *Saccharomyces boulardii* durante o estoque em diferentes temperaturas.

5.3 ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA PECTINA

A Figura 10 mostra o espectro de RMN ^1H da Amostra 1 (Pectina comercial), no qual são observados sinais alargados na linha de base entre 3,2 ppm e 5,0 ppm. Esta região é característica dos sinais dos hidrogênios que fazem parte das unidades de glicose. Devido ao alargamento dos sinais, não é possível fazer uma atribuição específica dos mesmos. Acredita-se que este alargamento seja causado pela diminuição do tempo de relaxação transversal (T_2). Este efeito observa-se comumente em macromoléculas como polímeros e biopolímeros.

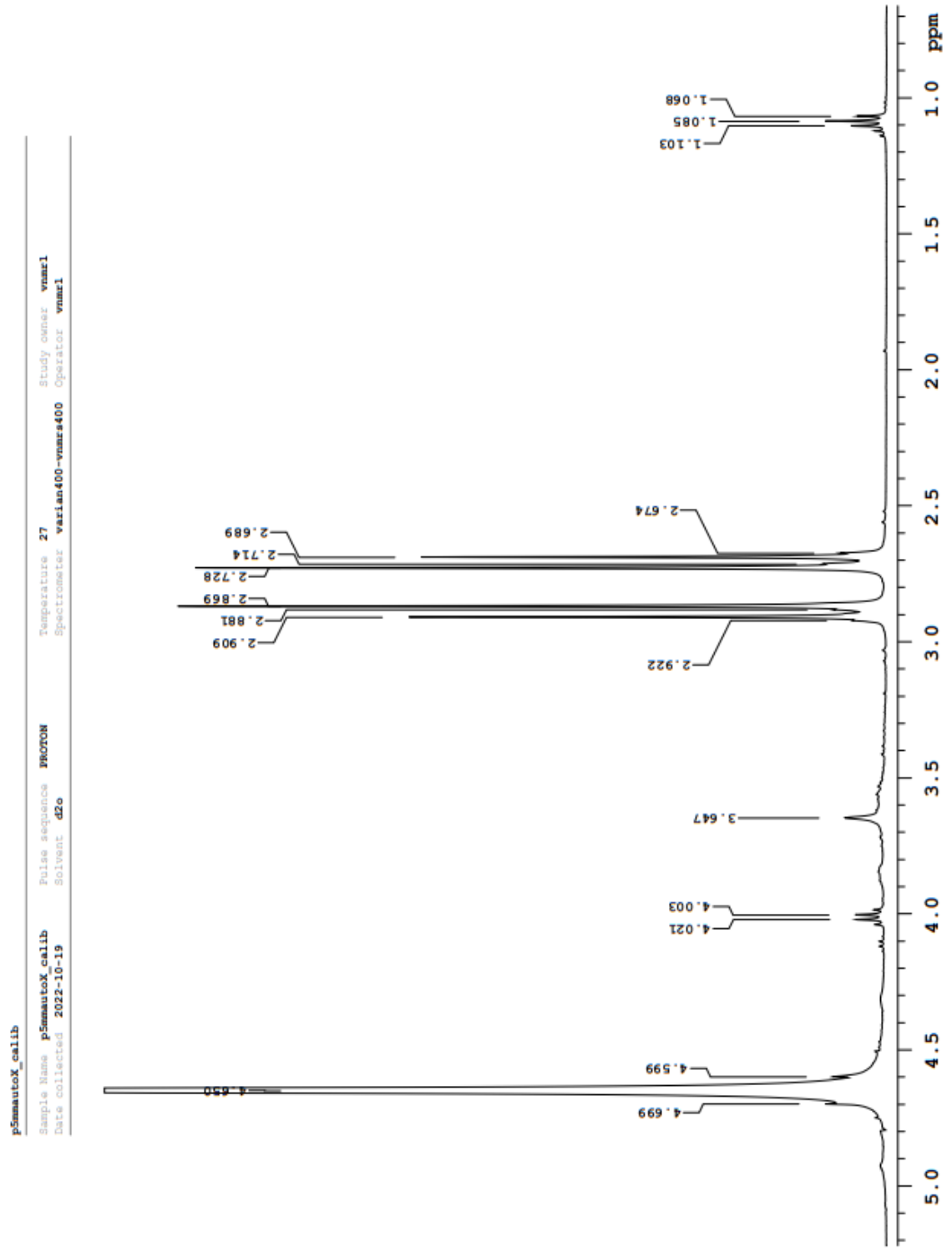
A Figura 11 mostra o espectro de RMN ^1H da pectina extraída do maracujá. Comparando com a Figura 10 pode-se perceber na linha de base os sinais alargados da pectina. Além disso, observamos etanol remanescente do processo de extração. O tripeto em 1,08 ppm e o quarteto em 4,01 correspondem ao CH_3 e ao CH_2 do etanol, respectivamente. Foi detectado também a presença de ácido cítrico através dos sinais intensos em 2,71 ppm e 2,88 ppm.

Figura 10 – Espectro de RMN ^1H 400 MHz. da Amostra 1 (pectina comercial) 20 mg em D_2O .



Fonte: O autor, 2022.

Figura 11 – Espectro de RMN ^1H 400 MHz. da Amostra 2 (pectina MC) 20 mg em D_2O .



Fonte: O autor, 2022.

5.4 COMPORTAMENTO DAS BEBIDAS APÓS FERMENTAÇÃO

A viabilidade celular inicial de *L. rhamnosus* adicionada às bebidas foi de 6,5 log UFC/mL e após 24h de fermentação as amostras apresentaram uma viabilidade média de 7,7 ($\pm 0,14$) log UFC/ml, crescimento de 1,2 log UFC/mL em 24 horas (produtividade celular de 0,05 log UFC/mL.h). O processo fermentativo provoca alterações desejáveis no produto, incluindo a incorporação de aromas característicos, aumento da biodisponibilidade de minerais e a supressão da flora contaminante e consequente segurança microbiológica, devido a redução do pH, bem como, promove o aumento dos AGCC, que são benéficos ao hospedeiro (KLEWICKA *et al.*, 2015; TAYLOR, 2016). Todos os ensaios apresentavam a mesma composição durante a fermentação, por este motivo a viabilidade após a fermentação foi semelhante entre eles, entretanto, observou-se um discreto aumento no E1 (Sacarose 5% e Pectina 5g/L). Vale ressaltar que este momento foi considerado o início do estoque das bebidas.

A viabilidade reflete a capacidade da célula crescer e, subsequentemente, gerar colônias de células em condições ambientais definidas, sendo considerada um pré-requisito para avaliar a funcionalidade de probióticos podendo variar de acordo com a linhagem (TERPOU *et al.*, 2019). Neste caso, durante a fermentação, a linhagem foi mantida em condições favoráveis de temperatura e pH, além disso o meio de cultura a base de MC também contribuiu positivamente, refletindo no crescimento bacteriano. SILVA *et al.* (2013) mencionaram a temperatura ideal de crescimento de 37°C e o pH variando entre 6,0 e 6,5 como mais favoráveis para *L. rhamnosus*.

A indústria de alimentos tem o objetivo de garantir que os produtos contenham um mínimo de 6 log UFC/ml ou grama no produto e, por sua vez, sugere-se uma ingestão diária de probióticos de 8 - 9 log UFC/ml ou grama para garantir que seu potencial seja efetivamente aproveitado, desta forma, os ensaios apresentaram quantidade de células probióticas superiores as exigidas para garantir os benefícios a microbiota intestinal (LILO-PEREZ *et al.*, 2021).

Com relação aos carboidratos, durante a fermentação observou-se um consumo médio de glicose e frutose entre os ensaios de 72,3% e 52,7%, respectivamente, portanto, a glicose foi o substrato preferido por *L. rhamnosus* ATCC

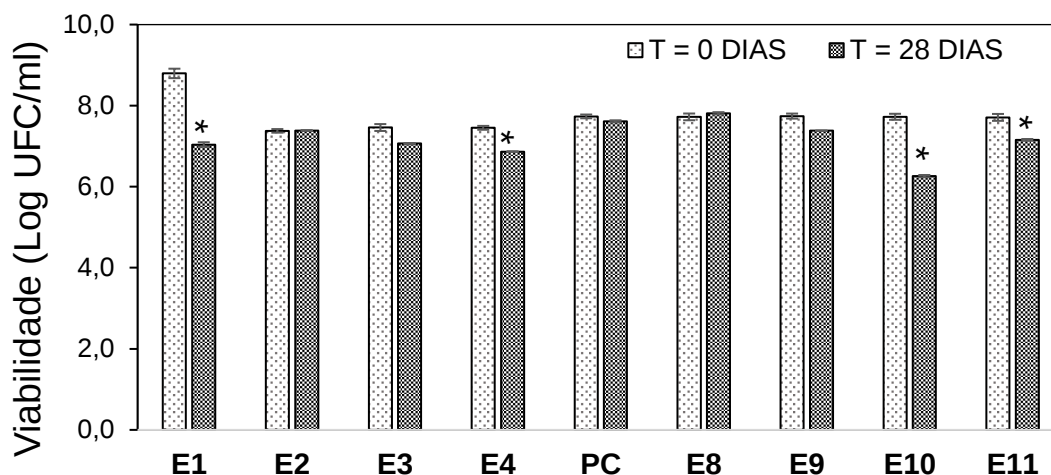
7469 neste momento. A literatura descreve uma preferência desta linhagem por glicose e frutose como substrato energético entre os açúcares simples, no entanto, fatores como a disponibilidade dos açúcares no meio, o tempo de fermentação, bem como as condições do processo podem interferir no metabolismo e utilização dos carboidratos (FILHO *et al.*, 2019; KLONGKLAEW *et al.*, 2022).

Lu *et al.* (2018) demonstraram a utilização de açúcares por três cepas probióticas (*L. helveticus* L10, *L. paracasei* L26 e *L. rhamnosus* HN001) em suco fermentado de carambola e observaram que a sacarose foi totalmente esgotada, a frutose sofreu diminuição significativa durante o processo, enquanto a glicose permaneceu inalterada. Acredita-se que as linhagens utilizaram glicose e frutose como fonte de energia formada a partir da hidrólise da sacarose.

5.5 VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA DE *L. RHAMNOSUS* ATTC 7469 DURANTE ESTOQUE REFRIGERADO

As condições cuja concentração de pectina adicionadas foram próximas ao ponto central mantiveram a estabilidade, no entanto, apesar de em outras condições (E1, E4, E10, E11) ocorrer decréscimo significativo da viabilidade de *L. rhamnosus*, esta foi mantida proporções suficientes para atender aos requisitos propostos pela indústria ao longo dos 28 dias de estoque (média de 7,1 ($\pm 0,02$) Log UFC/ml) (Figura 12), apesar da redução na contagem de viáveis de células com o tempo de armazenamento ser esperada. Este fato pode ser atribuído à redução do pH da matriz fermentativa e acúmulo de ácidos orgânicos provenientes de atividades metabólicas como resultado do crescimento e fermentação (ADEBAYO-TAYO *et al.*, 2021).

Figura 12 – Viabilidade média de *L. rhamnosus* ATCC 7469 no início (T=0 dias) e ao final (T = 28 dias) do estoque.



O ponto central (PC) corresponde aos ensaios E5, E6 e E7.

O asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o início e final do estoque. Fonte: O autor, 2022.

Resultados semelhantes foram observados por Campos *et al.* (2019) em suco de abacaxi e jussara, onde os níveis de *L. rhamnosus* GG permaneceram acima de 7 log UFC/mL durante 28 dias de estoque a 8°C. Isto demonstra a capacidade de adaptação da linhagem, mesmo em matrizes alimentares não lácteas e sofrendo influência diversos fatores limitantes, tais como acidez, pH, temperatura, componentes microbianos, concentração de oxigênio, entre outros (MANTZOURANI *et al.*, 2019).

As melhores condições para manutenção da sobrevivência de *L. rhamnonus* foram investigadas usando o DCCR, e a sobrevivência após o estoque foi descrita na Tabela 4. Os resultados evidenciam que a concentração de pectina é uma variável com efeito positivo significativo na sobrevivência de *L. rhamnosus*, enquanto as concentrações de sacarose não apresentaram significância estatística.

Tabela 4 – Sobrevivência do probiótico ao estoque refrigerado, de acordo com as condições do DCCR.

Ensaio	Sacarose (%)	Pectina (g/L)	Sobrevivência (%)
E1	5	5,0	78,5 ± 0,8
E2	15	5,0	100,1 ± 0,2
E3	5	20,0	96,2 ± 0,1
E4	15	20,0	92,9 ± 0,5
PC	10	12,5	98,2 ± 1,3
E8	3	12,5	102,7 ± 0,5
E9	17	12,5	97,4 ± 0,1
E10	10	2,0	82,3 ± 0,3
E11	10	23,0	94,0 ± 0,4

O ponto central (PC) corresponde aos ensaios E5, E6 e E7.

Um modelo quadrático foi utilizado para avaliar a sobrevivência, e o nível de significância do modelo foi mensurado pelo Teste-F, o qual revelou que a regressão foi estatisticamente significativa (Tabela 5).

As médias quadráticas (MQ) são calculadas pela razão entre as somas quadráticas e os graus de liberdade. A razão entre a MQ da regressão (MQR) pela MQ do resíduo (MQr) deve ser maior que o Teste-F tabelado para 95% de confiança. Por esta razão o resultado foi satisfatório, uma vez que o resultado da divisão ($F_{\text{calc}} = 8,7096$) foi maior que o valor do Teste-F tabelado ($F_{\text{tab}} = 6,26$), ou seja, existe uma evidência estatística suficiente para fazer acreditar na existência de uma relação linear entre as variáveis e a resposta.

Tabela 5 – Análise da variância (ANOVA) do modelo linear do planejamento fatorial.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	575,71	5	115,14
Resíduo	52,88	4	13,22
Falta de Ajuste	46,65	3	15,55
Erro Puro	6,23	1	6,23
Total	628,60	9	-
% de variação explicada			0,9159
% máxima de variação explicável			0,9901

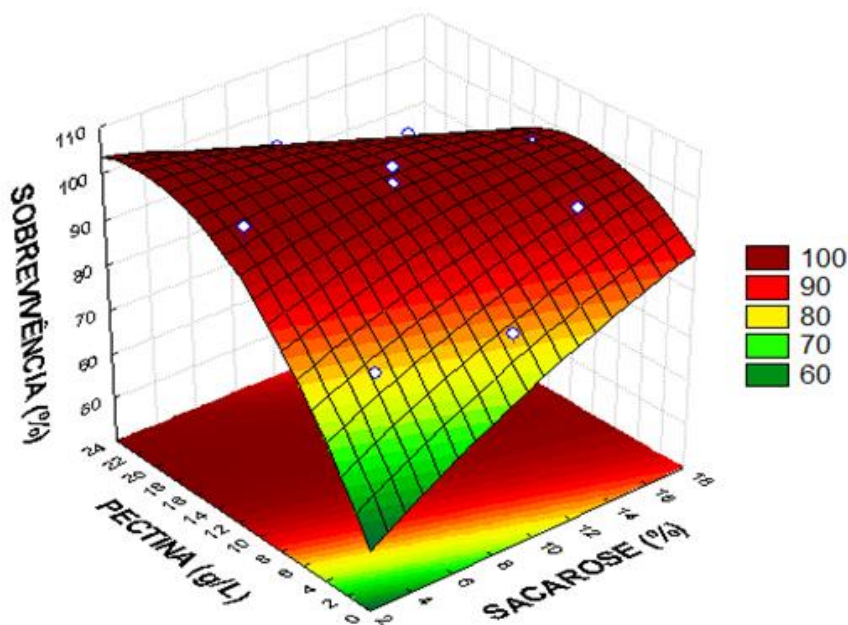
Por outro lado, a razão entre a MQ por falta de ajuste (MQfaj) e a MQ pelo erro puro (MQep) deve ser menor que o Teste-F tabelado ($F_{\text{tab}} = 215,7$), desta forma resultado foi satisfatório pois o valor da divisão foi de $F_{\text{calc}} = 2,4951$, reforçando o resultado significativo da análise da regressão. O coeficiente de determinação do modelo (R^2) foi de 0,9158. Isto que significa que 91,58% da variação total em torno da média é explicado pela regressão e para os resíduos ficam apenas 8,42%.

A equação polinomial de segunda ordem para a sobrevivência foi representada pela Equação 6.

$$\hat{y} = 101,6 + 0,21x_1 + 4,46x_2 - 1,32x_1^2 - 7,15x_2^2 - 6,42x_1x_2 \quad \text{Eq. (6)}$$

A superfície de resposta que mostra o comportamento da sobrevivência de *L. rhamnosus* em função das variáveis independentes (concentrações de sacarose e pectina) está representada pela Figura 13.

Figura 13 – Superfície de resposta obtidas para sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 após estoque de 28 dias, em função das concentrações de sacarose e pectina nas bebidas simbióticas fermentadas do maracujá da Caatinga.



Fonte: O autor, 2022.

É possível observar que existe uma região de maior sobrevivência próxima ao ponto central. Nas concentrações de pectina inferiores a 4g/L e de sacarose inferiores a 10g/L as sobrevivências obtidas foram menores que 80%, no entanto dependendo da viabilidade inicial do estoque, estes resultados permanecem positivos, como no presente estudo, onde a concentração inicial foi em média 7,7 ($\pm 0,02$) Log UFC/mL, uma sobrevivência acima de 80% durante o estoque mantém o produto viável para atender os requisitos mínimos para alimentos probióticos propostos pela indústria.

Além disso, observou-se que o efeito da pectina impacta positivamente na sobrevivência independente de baixas concentrações de sacarose, ou seja, quanto maior a concentração de pectina, mesmo quando a sacarose esteve em seus menores níveis a sobrevivência chegou a 100%. Verificou-se também que mesmo em suas maiores concentrações, a sacarose foi dependente de pectina para manter a sobrevivência mais elevada.

Estudos demonstram o efeito positivo da pectina na proteção de bactérias benéficas, sendo estes relacionados ao seu grau de metoxilação e ramificação, peso molecular e viscosidade. Larsen *et al.* (2018) mencionam que interações eletrostáticas entre bactérias e pectinas também contribuem para a sobrevivência de probióticos. Por sua capacidade de formar gel, a pectina pode atuar retardando a penetração de fluidos nas células, desta forma serviria como barreira de proteção em meios ácidos por exemplo, favorecendo a manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus* como observado em alguns estudos (CHOTIKO & SATHIVEL, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; PRANDI *et al.*, 2018). Outros autores também relatam que bactérias ácido lácticas possuem a capacidade de hidrolisar pectina e utiliza-la como fonte de nutrientes para crescimento bacteriano (VIDHYASAGAR *et al.*, 2013; SHOWPANISH *et al.*, 2020), diante deste cenário, a presença de pectina seria benéfica independente da forma que fosse utilizada, pois mesmo que o microrganismo não seja capaz de metabolizá-la, o consumidor estaria ingerindo como fonte prebiótica.

No estudo de Santos *et al.*, (2017) que avaliaram a adição de pectina na formulação de bebidas probióticas não lácteas, a pectina extraída da casca do maracujá da Caatinga na concentração de 20 g/L contribuiu significativamente para a manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o estoque da bebida. No entanto, a concentração de sacarose foi a mesma para todos os ensaios (10%). Mesmo não sendo possível avaliar a influência de diferentes concentrações de sacarose no estudo mencionado anteriormente, obtivemos um comportamento semelhante uma vez que as concentrações mais altas de pectina e inferiores de sacarose favoreceram a sobrevivência de *L. rhamnosus*, inclusive, na concentração de 10% de sacarose e 20g/L de pectina a sobrevivência permaneceu acima de 90%.

As concentrações mais baixas de sacarose para manutenção da sobrevivência nos ensaios cujas concentrações de pectina estavam acima de 12g/L evidenciada no presente estudo pode ser considerada um fator positivo, uma vez que é possível manter a sobrevivência do microrganismo e seus atributos funcionais sem aumentar o seu valor calórico. No entanto, a redução do açúcar em bebidas fermentadas implica em uma série de questões incluindo a aceitabilidade, textura e estabilidade do produto; além disso, pode afetar negativamente a fermentação, tornando o processo mais lento e com maiores chances de contaminação por bactérias indesejáveis (MESQUITA *et al.*, 2020).

Outros estudos demonstram que a sacarose é determinante para a sobrevivência de probióticos. Pereira *et al.* (2013) ao avaliar sucos probióticos de caju adoçados ou não com sacarose e observaram seu efeito no armazenamento de 42 dias e concluíram que a sacarose foi utilizada como substrato para promover o crescimento microbiano. Resultados semelhantes foram encontrados por Filho *et al.* (2019) em seu estudo, avaliando a utilização do suco de cacau como veículo para o *Lactobacillus casei* observaram um aumento da viabilidade na presença da sacarose, isto porque a sacarose é um composto fermentável e o aumento da viabilidade microbiana pode ser esperado.

5.6 COMPORTAMENTO DO PH DAS BEBIDAS DURANTE O ESTOQUE

O pH médio das bebidas foi de 5,3 ($\pm 0,2$) (Coeficiente de Variação - CV <4%) no início e 5,1 ($\pm 0,3$) (CV <5%) no final do estoque, e as variações de pH de cada ensaio estão descritas na Tabela 6. Apesar da diminuição durante a fermentação (ajustado anteriormente para pH 6.0), o pH médio durante o estoque manteve-se superior a 5,0 correspondendo a um resultado positivo, uma vez que mesmo sendo fermentadas, as bebidas não são ácidas o suficiente para afetar negativamente os atributos sensoriais. Isto também nos faz refletir sobre a sobrevivência do microrganismo que pode ter sido beneficiada pela pequena diminuição do pH apesar das diferenças significativas entre o início e final do estoque na maioria dos ensaios.

Mesquita *et al.* (2020) avaliaram a fermentabilidade de bebidas à base de grão de bico e extrato de coco contendo o probiótico *L. paracasei* LBC 81, e mencionam que grandes alterações sofridas em termos de pH e acidez, apesar de não afetarem a viabilidade probiótica, pode ser um fator limitante do ponto de vista de aceitação sensorial, além de comprometer o tempo de armazenamento do produto, no entanto, o ensaio que apresentou a menor sobrevivência ao final do estoque foi o E1 que apresentou maior variação de pH.

Tabela 6 – Variações de pH nos ensaios no início e ao final do estoque. O ponto central (PC) corresponde aos ensaios E5, E6 e E7.

Ensaio	pH - Início do Estoque (T = 0 dias)	pH - Final do Estoque (T = 28 dias)	<i>p</i>
E1	4,91	5,56*	0,007
E2	5,21	5,25	0,154
E3	5,45	5,19*	0,001
E4	5,39	5,23*	0,007
PC	5,27	5,31	0,056
E8	5,34	4,77*	0,003
E9	5,35	4,78*	0,000
E10	5,42	5,07*	0,007
E11	5,38	4,85*	0,001

O asterisco indica que houve diferença estatisticamente significativa entre o início e o final do estoque ($p \leq 0,05$).

Este mesmo ensaio também foi o único que apresentou aumento de pH durante o estoque e pode ser explicado pela degradação do ácido láctico ou sua conversão em outros produtos, como 1,2-propanodiol, visto que já foi relatada sua produção por outras espécies de *Lactobacillus*, dependendo dos constituintes presentes no meio (OUDE ELFERINK *et al*, 2001).

A manutenção da viabilidade celular de probióticos em matrizes alimentares não lácteas é bastante desafiadora, uma vez que a maioria destes microrganismos é isolada de fontes lácteas, e as linhagens não encontram condições favoráveis para manterem-se viáveis em outras matrizes. Durante anos, acreditou-se que a presença de compostos fenólicos, entre outros constituintes da matriz da planta, inibia os probióticos; além disso, matrizes vegetais apresentam pH desfavorável, fatores antinutricionais e falta de capacidade tamponante (MORAIS *et al.*, 2019; RASIKA *et al.*, 2021). No entanto, acredita-se que a viabilidade probiótica em bebidas à base de sucos de frutas apresenta um aumento significativo devido à fermentação das frutas,

assim como o conteúdo lipídico encontrado em algumas matrizes de origem não láctea e a fisiologia única das plantas ajudam a proteger os probióticos contra diferentes tipos de estressores (MANTZOURANI *et al.*, 2019).

Estudos têm mostrado um efeito prebiótico de ácidos fenólicos, flavonóides e betacianinas, estimulando o crescimento de bactérias probióticas. Ademais, o ajuste do pH antes da fermentação como realizado no presente estudo contribuiu para minimizar possíveis efeitos negativos da matriz vegetal (MORAIS *et al.*, 2019; PIMENTEL *et al.*, 2021).

5.7 VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS E CARBOIDRATOS

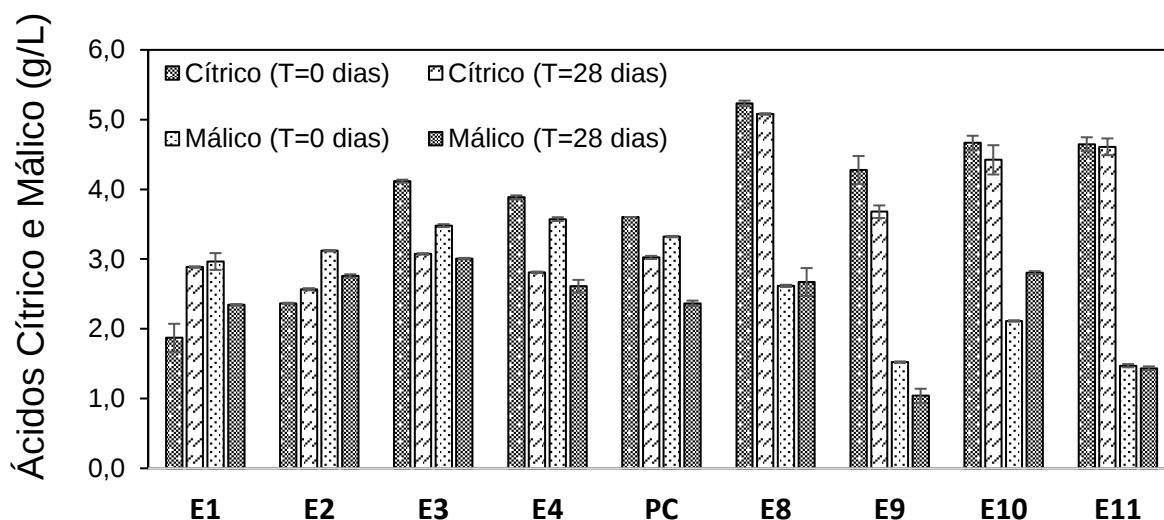
As concentrações iniciais e finais obtidas foram $2,69 \pm 0,8$ e $2,34 \pm 0,6$ g/L para o ácido málico e $3,85 \pm 1,0$ e $3,57 \pm 0,9$ g/L para o cítrico, respectivamente. Farias *et al.* (2016), encontraram concentrações de ácido cítrico e málico de $5,81 \pm 0,3$ e $0,78 \pm 0,05$ g/l, respectivamente, em bebida probiótica a base de maracujá da Caatinga que permaneceram constante ao longo da realização de estudo cinético da fermentação, utilizando concentração de polpa de aproximadamente 15% v/v. Estas diferenças nas concentrações são influenciadas por fatores como o grau de maturação do fruto, concentração da polpa utilizada na elaboração da bebida, e das diferentes linhagens probióticas presentes no produto. O ácido cítrico é o acidulante mais comum em alimentos produzidos em escala industrial e ácido málico é o segundo ácido mais abundante em frutas, sendo um dos responsáveis pelo sabor e aroma dos frutos. Desta forma, quantificar estes ácidos é importante por serem constituintes dos frutos que podem servir como substrato para algumas linhagens probióticas, colaborando na manutenção da sua sobrevivência (SEQUEIRA, 2012; VALERO-CASES & FRUTOS, 2017).

No ácido málico observou-se uma diminuição das concentrações na maioria das condições ao longo do estoque de 28 dias, exceto no E10 (Sacarose 10% e Pectina 2g/L), que apresentou discreto crescimento (0,7 g/L) (Figura 14). Valero-Cases e Frutos (2017), produzindo um suco probiótico de laranja com cenoura mantido em estoque refrigerado por 40 dias, observaram que os monossacarídeos e o ácido málico foram os substratos preferidos para *L. acidophilus*, quando comparados

à sacarose e ao ácido cítrico, este achado pode justificar a diminuição das concentrações do ácido málico observado na maioria dos ensaios do presente estudo. Este comportamento também ser atribuído em partes pela descarboxilação do ácido málico em lactato que pode ser promovida pela maioria dos *Lactobacillus* pela ação da enzima malolática (LU *et al.* 2018).

Xiong *et al.* (2014) observaram na fermentação (temperatura de 20 a 25°C durante 7 dias) de chucrute chinês que *L. plantarum* e *L. casei* reduziram a concentração de ácido cítrico, sendo esse composto consumido pelos microrganismos. Neste estudo comportamento semelhante foi observado na maioria dos ensaios. Situação oposta, foi observada no E1 principalmente, ensaio com menor sobrevivência, que apresentou um aumento na concentração, ou seja, onde haviam menos bactérias, o aumento da concentração foi proporcionalmente mais alto.

Figura 14 – Variação nas concentrações dos ácidos cítrico e málico ao avaliar a diferença no início (T=0 dias) e ao final do estoque (T= 28 dias).

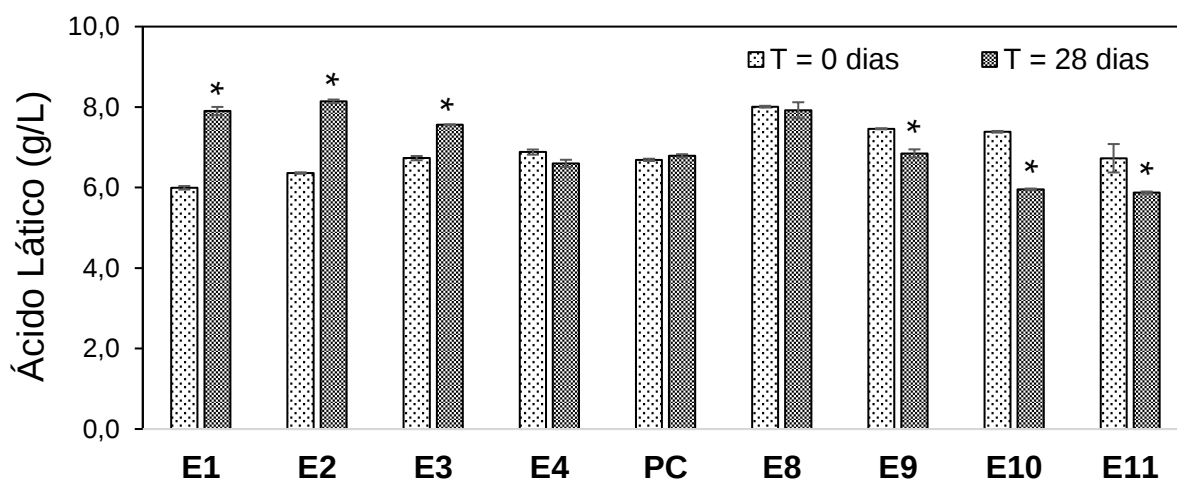


Fonte: O autor, 2022

A média das concentrações do ácido láctico após fermentação e ao final do estoque (Figura 15) foram de 7,03 ($\pm 0,8$) e 7,2 ($\pm 1,0$) g/L respectivamente, resultado

semelhante ao obtido por Farias *et al.* (2016), que obtiveram concentrações de 6 g/L depois da fermentação e manteve-se constante após estoque de 28 dias ($6,2 \pm 0,5$ g/L), nas mesmas condições do presente estudo e ao desenvolver bebida probiótica com a mesma linhagem e espécie de maracujá. Em contrapartida, Adebayo-Tayo *et al.* (2021) obtiveram concentrações superiores a 17,5g/L de ácido láctico em suas bebidas à base de suco de manga com *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici* armazenados a 4° e 25° C por 28 dias.

Figura 15 – Concentração de ácido láctico nos ensaios no início (T=0) e ao final (T=28 dias) do estoque.



O asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o início e final do estoque.

Fonte: O autor, 2022

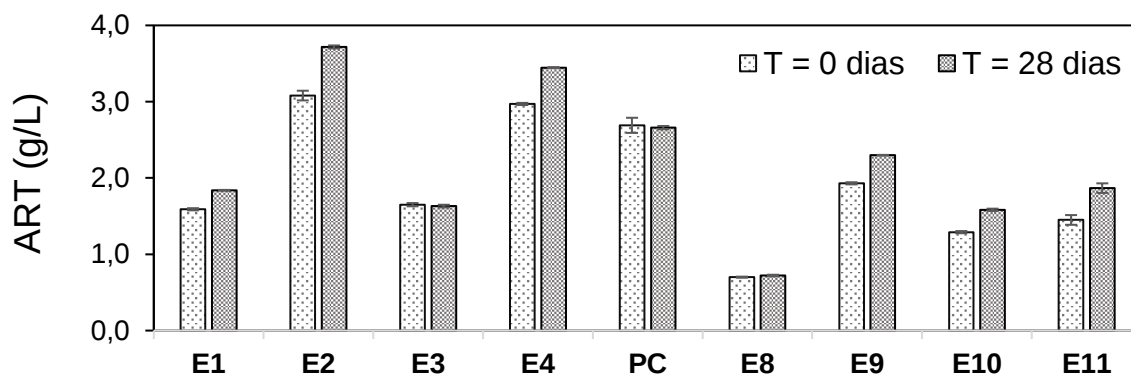
Altas concentrações de ácido láctico tendem a atenuar o seu sabor no produto e podem contribuir negativamente na sua qualidade sensorial, além disso, tende a baixar o pH do meio, tornando o ambiente hostil e intolerável para a maioria das bactérias ácido lácticas, incluindo *L. rhamnosus*, afetando diretamente sua viabilidade e desempenho. Isto foi observado no E1, onde a concentração de ácido láctico aumentou significativamente durante o estoque (1,91 g/L) e refletiu de forma negativa na sobrevivência do probiótico. Entretanto, no E3 apesar do aumento significativo do ácido láctico, refletindo na discreta diminuição do pH não foi capaz de afetar a sobrevivência de *L. rhamnosus*, provavelmente devido as concentrações favoráveis

de pectina (20g/L) e sacarose (5%) que contribuíram para a manutenção da sobrevivência. O aumento no E2 pode ser reflexo da alta concentração de sacarose (15%) que serviu de substrato energético para o probiótico e refletiu positivamente na sua sobrevivência.

Os ensaios E4 (15% de sacarose e 20 de pectina) e PC (10% de sacarose e 12,5 g/L de pectina) apresentaram estabilidade nas concentrações de ácido láctico, assim como o E8 que se manteve estável e apresentou a maior produção pós fermentação ($9,1 \pm 0,05$ g/L), corroborando com a diminuição mais evidente do pH (4,77) após 28 dias. Lu *et al.*, (2018) com suco fermentado de carambola observou que *L. rhamnosus* produziu níveis significativamente maiores de ácido láctico (4,4 g/L) do que *L. helveticus* (3,43 g/L) e *L. paracasei* (3,70 g/L) em correlação com o padrão de consumo de açúcar, resultando em uma importante diminuição do pH para 4,4. Este comportamento é esperado visto que neste mesmo ensaio foi evidenciada a maior sobrevivência (102,7%), resultando na maior produção de ácido láctico e diminuição significativa de pH. A presença do ácido láctico é importante pois ele é considerado um agente antimicrobiano, impedindo a contaminação do produto durante o período de estocagem (PIMENTEL *et al.*, 2015).

Os açúcares redutores apresentaram aumento ao longo do estoque na maioria dos ensaios (Figura 16). No estudo de Lu *et al.* (2018), que avaliaram comportamento de três linhagens (*L. helveticus* L10, *L. paracasei* L26 e *L. rhamnosus* HN00) na fermentação de suco de carambola, observou-se que a sacarose foi totalmente esgotada, levando a crer que houve formação de glicose e frutose a partir da hidrólise da sacarose.

Figura 16 – Concentração de açúcares redutores totais (ART) no início e ao final do estoque, o PC corresponde aos ensaios E5, E6 e E7.



Fonte: O autor, 2022

Comportamento semelhante pode ser observado no presente estudo, uma vez que, nos ensaios E2, E4 e E11 cujas concentrações de sacarose para formulação das bebidas foram as maiores (15%, 15% e 17%) houve o maior incremento nas concentrações de ART provavelmente pela ocorrência da hidrólise da sacarose. Além disso, a baixa temperatura de armazenamento, uma vez que o produto foi mantido em refrigeração contribui para uma menor atividade bacteriana e consequentemente estes carboidratos foram consumidos mais lentamente, tendência observada em todos os ensaios que mantiveram ou aumentaram suas concentrações de ART durante o estoque (ANDRADE *et al.*, 2019).

No E1, mesmo com o aumento da concentração de ART na bebida, indicando que haviam nutrientes para manutenção da sobrevivência do probiótico, esta foi a menor entre os ensaios. Ding & Shah (2008) relatam que células mortas também são capazes de liberar enzimas que hidrolisam sacarose, o que pode justificar este aumento.

5.8 SOBREVIVÊNCIA DE *L. RHAMNOSUS* APÓS SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

De acordo com os resultados do planejamento foi possível determinar entre as concentrações estudadas os ensaios com maior potencial de sobrevivência durante o

estoque de 28 dias e mensurar a capacidade do probiótico de resistir as condições gastrointestinais simuladas.

Os ensaios E3 (5% de sacarose e 20 g/L de pectina) e PC (10% de sacarose e 12,5 g/L de pectina) foram submetidos ao teste. Ambos apresentaram viabilidade no início próximas a 7 log UFC/ml (E3 – 7,3 log UFC/ml e PC – 7,5 log UFC/ml) e declínio para aproximadamente 5 log UFC/ml ao final do teste, sendo a taxa de sobrevivência ligeiramente mais alta no E3 de 68,8% quando comparada ao PC que foi de 66,1%. Estes achados corroboram com os resultados obtidos no planejamento, demonstrando a capacidade de contribuição da pectina em manter viva a linhagem probiótica, desta vez mesmo em condições de estresse.

Estudos como o de Larsen *et al.* (2018) mostram que as pectinas apresentam potencial para melhorar a sobrevivência de espécies probióticas de *Lactobacillus*, como foi o caso de *L. rhamnosus* GG exposto a estresses gastrointestinais, como baixo pH e enzimas digestivas. Khorasani & Shojaosadati (2016) descreveram uma formulação contendo pectina usada para aprisionar o probiótico *Bacillus coagulans* e aumentar sua taxa de sobrevivência em fluidos gastrointestinais. Foi relatado também que as matrizes simbióticas suplementadas com oligossacarídeos pépticos tiveram um efeito protetor maior sobre *B. breve*, *L. acidophilus* e *L. reuteri* em comparação com o alginato sozinho (CHALUVADI *et al.*, 2012).

Os mecanismos associados aos efeitos das pectina na sobrevivência bacteriana estão relacionados as suas diversas propriedades, entre elas, grau de metoxilação, peso molecular, grau de ramificação e viscosidade que tornam as preparações à base de pectina um bom meio de aprisionamento para células bacterianas para entrega direcionada ao cólon, além das complexas variações das cargas superficiais e, assim, às interações eletrostáticas entre pectinas e bactérias que podem inibir ou promover a sobrevivência dependendo de sua natureza (NAQASH *et al.*, 2017; LARSEN *et al.*, 2018).

Os resultados evidenciados no presente estudo também são totalmente influenciados pela matriz alimentar no qual a bebida foi produzida, neste caso o MC, tanto pela polpa, quando pela pectina proveniente de sua casca. Mendes *et al.* (2021) ao produzir dois tipos de Kefir, sendo um com MC e outro com o maracujá amarelo,

verificaram que o Kefir de MC foi capaz de manter sobrevivência de bactérias acima de 75% durante todo o estoque de 60 dias, resultados superiores quando comparado ao Kefir do maracujá amarelo, que apresentou declínio durante o estoque, chegando a 47% de sobrevivência aos 60 dias.

No que diz respeito a *L. rhamnosus*, Campos *et al.* (2019) investigaram o comportamento da linhagem em suco fermentado de abacaxi e jussara quando submetido a condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e *in vivo* obtiveram uma sobrevivência de aproximadamente 77%, bem como Farias *et al.* (2016), que observaram que *L. rhamnosus* incorporado a suco de MC também foi capaz de sobreviver a condições adversas do TGI.

A ausência de sais biliares conforme metodologia utilizada pode ser um fator contribuinte para manutenção da sobrevivência frente ao estresse do procedimento, uma vez que a literatura relata seus efeitos prejudiciais aos microrganismos inibindo seu crescimento, no entanto, diversos estudos relatam que *L. rhamnosus* foram capazes de crescer e sobreviver em meios com baixo pH e concentrações de bile de até 2% (SHI *et al.*, 2012; REALE *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2019).

No entanto, Farias *et al.* (2016) relataram que não houve sobrevivência de *L. rhamnosus* em pH abaixo de 2.5 no teste de simulação gastrointestinal. Da mesma forma, Geres *et al.* (2011) trabalharam com *L. rhamnosus* CRL 1505 e também observaram uma viabilidade abaixo de 2 Log UFC/mL após 120 minutos de simulação do suco gástrico. Diante do exposto, observa-se que com a diminuição brusca do pH já ocorre a morte de maior parte das células, sendo este um fator mais relevante do que os próprios sais biliares na sobrevivência celular.

Esses estudos confirmam a versatilidade de *L. rhamnosus* que pode ser incorporado a diferentes produtos funcionais potencializando seus efeitos benéficos, atendendo a consumidores com preferências alimentares variadas e mantendo a qualidade do produto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O maracujá da Caatinga se mostrou uma matriz favorável para extração da pectina, apresentando um bom rendimento quando comparado a outros frutos, fator que além das características intrínsecas do MC, pode ser atribuído a otimização da metodologia de extração na etapa de filtração do coagulado péptico.

A utilização do fruto também foi positiva na produção de bebidas simbióticas de origem não láctea, mantendo estável a viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469 na maioria dos ensaios durante os 28 dias de estoque. Apesar de alguns ensaios apresentarem decréscimo significativo na viabilidade, os mesmos conseguiram mantê-la em proporções suficientes para atender aos requisitos propostos pela indústria para alimentos probióticos.

A pectina da casca do maracujá da Caatinga apresentou efeito positivo significativo na sobrevivência probiótica de acordo com o DCCR, e foi determinante para o incremento da sobrevivência ao longo do estoque. Também foi possível identificar as concentrações capazes de manter a sobrevivência em níveis superiores a 90%, desta forma, não sendo necessárias concentrações tão elevadas de sacarose para elaboração da bebida, o que contribui para a melhora do valor nutricional da formulação.

Mesmo após o estresse no qual *L. rhamnosus* foi submetido, através do teste de simulação gastrointestinal, a linhagem foi capaz de manter a sobrevivência em níveis satisfatórios (acima de 60%) fortalecendo sua utilização como probiótico com boa capacidade de adaptação a situações adversas, incluindo variações de pH.

Apesar das dificuldades na manutenção da viabilidade de probióticos em produtos a base de frutas, o ajuste do pH durante a produção das bebidas pode ter favorecido a sobrevivência do microrganismo e estabilidade do pH pode ser considerada um fator determinante para uma melhor aceitação sensorial do produto.

Limitações incluindo a necessidade de investigações do ponto de vista sensorial são importantes para avaliar o potencial de comercialização e aceitação das bebidas simbióticas, no entanto, em virtude da pandemia de COVID-19 e de outras questões como falta de matéria prima, impossibilitaram a realização destas análises, tornando estes questionamentos subsídio para futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS

ABBOUD KY, IACOMINI M, SIMAS FF, & CORDEIRO LMC. High methoxyl pectin from the soluble dietary fiber of passion fruit peel forms weak gel without the requirement of sugar addition. **Carbohydrate Polymers**. 2020;246, 116616.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Perguntas e respostas. Alteração taxonômica de espécies do gênero *Lactobacillus*. 1º Edição, 2021.

ALJUTAILY T, HUARTE E, MARTINEZ-MONTEAGUDO S, GONZALEZ-HERNANDEZ JL, ROVAI M, & SERGEEV IN. Probiotic-enriched milk and dairy products increase the gut microbiota diversity: A comparative study. **Nutrition Research**. 2020;82:25-33.

AL-RASHID E. H. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2021.

ALVES NN, MESSAOUD GB, EPHANE DESOBRY S. et al. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**. 2016;189:45-54.

AMANDA E, & CHOO WS. Effect of refrigerated storage on the physicochemical characteristics and viability of *Lactobacillus plantarum* in fermented watermelon juice with or without supplementation with inulin or fructooligosaccharide. **Journal of Food Processing and Preservation**. 2018;42(12):13831.

AMARA AA, SHIBL A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**. 2015;23(2):107–114.

ANDERSON ST & PASCHOS GK (2019). The role for the microbiome in the regulation of the circadian clock and metabolism. **Nutritional Epigenomics**. 2019;231–248.

ARAÚJO AJB et al. Caracterização físico-química e perfil lipídico da semente de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2019.

ARAÚJO AJB. et al. Caracterização físico-química e perfil lipídico da semente de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2019.

ARAÚJO FP, SANTOS CAF, SILVA GC, & ASSIS JS. Caracterização de frutos de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). In Congresso nacional de botânica, 53.; Reunião nordestina de botânica, 25, Recife, 2002.

ASHAOLU T J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2020;130, 110625.

ATARASHI K, SUDA W, LUO C, KAWAGUCHI T, MOTOO I, NARUSHIMA S, KIGUCHI Y, et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. **Science**. 2017;358(6361):359-365.

BARRERA C, BURCA C, BETORET E, GARCÍA-HERNÁNDEZ J, HERNÁNDEZ M, & BETORET N. Improving antioxidant properties and probiotic effect of clementine juice inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) by trehalose addition and/or sublethal homogenisation. **International Journal of Food Science and Technology**. 2019;54:2109–2122

BERNARDEAU M, VERNOUX JP, HENRI-DUBERNET S, GUÉGUEN M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **International Journal Food Microbiology**. 2008 126(3):278-285.

BURITI FCA & SAAD SMI. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 2007;57(4):373-380.

CANTERI MHG, MORENO L, WOSIACKI G, SCHEER AP. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**. 2012;22(2)149-157.

CEAPA C, LAMBERT J, LIMPT, K.V.; WELS, M. et al. Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* Genotypes and Carbohydrate. Utilization Signatures Determined by Phenotype Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**. 2016;81(16):5458-5470.

CELUS M, KYOMUGASHO C, KERMANI ZJ, ROGGEN K, VAN LOEY AM, GRAUWET T & HENCRICKX ME, Fe²⁺ adsorption on citrus pectin is influenced by the degree and pattern of methylesterification. **Food Hydrocolloids**. 2017;73:101-109.

CELUS M, KYOMUGASHO C, VAN LOEY AM, GRAUWET T AND HENDRICKX ME, Influence of pectin structural properties on interactions with divalent cations and its associated functionalities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 2018;17(6):1576-1594.

CERQUEIRA-SILVA CBM, CONCEIÇÃO LDHCS, SOUZA AP, CORRÊA RX. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**. 2014;139:261-270.

CHALUVADI S, HOTCHKISS JT, CALL JE, LUCHANSKY JB, PHILLIPS JG, LIU L, YAM KL. Protection of probiotic bacteria in a synbiotic matrix following aerobic storage at 4°C. **Beneficial Microbes**. 2012;3:175-187.

CHANG CP, LIEW SL. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**. 2013;37:536-543.

CHENG D, SONG J, XIE M, SONG D. The bidirectional relationship between host physiology and microbiota and health benefits of probiotics: A review. **Trends in Food Science & Technology**. 2019;91:426-435.

CHOTIKO A & SATHIVEL S. Three protective agents for pectin-rice bran capsules for encapsulating *Lactobacillus plantarum*. **Food Bioscience**. 2016;16:56–65.

CHRIST A, LAUTERBACH E, LATZ E. Western diet and the immune system: Na inflammatory connection. **Immunity**. 2019;51(5):794-811.

CHRISTIAENS S, UWIBAMBE D, UYTTEBROEK M, DROOGENBROECK BV, LOEY AMV, & HENDRICKX M E. Pectin characterisation in vegetable waste streams: A starting point for waste valorisation in the food industry. **LWT-Food Science and Technology**. 2016;61:275-282.

COLLADO MC, ISOLAURI E, SALMINEN S, SANZ Y. The impact of probiotic on gut. health. **Current Drug Metabolism Bethesda**. 2009;10(1):68-78.

COQUEIRO AY, PEREIRA JRR, GALANTE F. Farinha da casca do fruto de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg (maracujá-amarelo): do potencial terapêutico aos efeitos adversos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 2016;18(2):563-569.
CÓRDOVA KRV, GAMA TMMTB, WINTER CMG, NETO GK, FREITAS RJS. Características físico-químicas da casca de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Deg) obtida por secagem Bol. CEPPA. 2005; 23:221-230.

CORONA O, RANDAZZO W, MICELI A, UARCELLO R, FRANCESCA N, ERTEN, MOSCHETTI G, SETTANI L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices, **Food Science and Technology**. 2016;66:572-581.

CORRÊA RCG, PERALTA RM, HAMINIUK CWI, et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (Passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**. 2016;1- 44.

CORZO N, ALONSO JL, AZPIROZ F, CALVO M A, CIRICI, M, LEIS R., et al. Prebiotics: Concept, properties and beneficial effects. **Nutricion Hospitalaria** 2015;31:99–118.

COSTA NA, DE ALMEIDA PAULA D, BRÊDA JD, RUFINO VIEIRA EN, FURTADO MARTINS EM, & RAMOS AM. A symbiotic dessert composed of yam (*Dioscorea sp.*) and Ubá mango pulp (*Mangifera indica L.*). **LWT**. 2020;133:110074.

COSTA VM. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido láctico. São Paulo, Piracicaba, 2006;65.

DE ALMEIDA BIANCHINI CAMPOS RC, MARTINS EMF, DE ANDRADE PIRES B, DO CARMO GOUVEIA PELUZIO, M., DA ROCHA CAMPOS, A. N., RAMOS, A. M., MARTINS ML. In vitro and in vivo resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus L. Merrill*) and jussara (*Euterpe edulis Martius*) juice to the gastrointestinal tract. **Food Research International**. 2018.

DE ARAÚJO FP, FALEIRO FG. Maracuyá de la Caatinga: *Passiflora cincinnata* Mast. 2020.

DE FAVERI A, DE FAVERI R, BROERING MF, BOUSFIELD I T, GOSS M J, MULLER S. et al. (2020). Effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis f. flavicarpa O. Deg.*) in cefeteria diet-induced metabolic disorders. **Journal of Ethnopharmacology**. 2020;205:112482.

DEY P, CHAUDHURI SR, EFFERTH T, PAL S. The intestinal 3M (microbiota, metabolism, metabolome) zeitgeist – from fundamentals to future challenges. **Free Radical Biology and Medicine**. 2021;176:265-285.

DO SOCORRO FERNANDES MARQUES S, LIBONATI R MF, SABAA-SRUR AU, LUO R, SHEJWALKAR P, HARA K., ... SMITH RE. Evaluation of the effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis fo. flavicarpa*) on metabolic changes in HIV patients with lipodystrophy syndrome secondary to antiretroviral therapy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2016;26(4):420–426.

DOUILLARD FP, RIBBERA A, KANT R, PIETILÄ TE, JÄRVINEN HM, MESSING M. et al. Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Strain GG. **PLOS Genetics**.2013;(8):1-15.

EMBRAPA. Embrapa lança primeira variedade de maracujá da Caatinga para cultivo comercial. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13304501/embrapa-lanca-primeira-variedade-de-maracuja-da-caatinga-para-cultivocomercial>>. Acesso em: 31 de agosto de 2020.

FARIAS N, SOARES M, GOUVEIA E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**. 2016;71:149-154.

FILHO ALS. et al. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT**. 2019;99:371-378.

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

FONSECA AMA, GERALDI VA, MAROSTICA JUNIOR MR, SILVESTRE AJD, ROCHA SM. Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*): A comprehensive review on the nutritional value, phytochemical profile and associated health effects. **Food Research International**. 2022;160:111665.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION.2002, posting date. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. (Online.)

FREIRE AL, RAMOS CL, SCHWAN RF. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Reserch International**. 2017;100(1):698–707.

FREITAS DE OLIVEIRA C, GIORDANI D, LUTCKEMIER R, GURAK PD, CLADERA-OLIVERA F, & FERREIRA MARCZAK LD. Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**. 2016; 71:110–115.

GANAN M, COLLINS M, RASTALL R, HOTCHKISS AT, CARRASCOSA AV & MARTINEZ-RODRIGUEZ AJ. Inhibition by POS of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **International Journal Food Microbiology**. 2010;37: 181-185.

GIBSON GR, HUTKINS R, SANDERS ME, PRESCOTT SL, REIMER R, SALMINEN SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Review Gastroenterol Hepatol**. 2017;14: 491–502.

GOMEZ B, GULLON B, YANEZ R, SCHOLS H, & ALONSO JL Prebiotic potential of pectins and POS derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. **Journal of Funct Foods**. 2016;20:108-121.

HARACH T, MARUNGRUANG N, DUTHILLEUL N, CHEATHAM V, MC COY KD FRISONI G, et al. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. **Scientific Reports**. 2017;7:41802.

ISTRATI DI, PRICOP EM, PROFIR AG, & VIZIREANU C. Fermented functional beverages. **Functional foods**. 2018:728-815

JAGRANI MINJ, et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2020;1-18.

JESUS R et al. DESENVOLVIMENTO E ACEITABILIDADE DE UM NÉCTAR MISTO DE MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes) E MARACUJÁ DO MATO (*Passiflora. cincinnata* Mast) ADOÇADO COM MEL DE *Apis mellífera*. **Enciclopédia biosfera**. 2017;14:26.

JORJÃO AL, OLIVEIRA FEDE, LEÃO MVP, et al. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. **The Scientific World Journal**. 2015:6

JUMPERTZ R, LE DS, TURNBAUGH PJ, TRINIDAD C, BOGARDUS C, GORDON J I, KRAKOFF J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2011;94(1):58-65.

KANDYLIS CP, PISSARIDI K, BEKATOROU A, KANELLAKI M, KOUTINAS AA. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**. 2016;7:58–63.

KHODAEI D, HAMIDI-ESFAHANI Z & LACROIX M, Gelatin and low methoxyl pectin films containing probiotics: Film characterization and cell viability. **Food Bioscience**. 2020;36: 100660.

KHORASANI AC & SHOJAOSADATI SA. Bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposites as prebiotics against drying and gastrointestinal condition. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2016; 83:9–18.

KLEWICKA E, ZDUŃCZYK Z, JUŚKIEWICZ J, & KLEWICKI R. Effects of lactofermented beetroot juice alone or with N-nitroso-N-methylurea on selected metabolic parameters, composition of the microbiota adhering to the gut epithelium and antioxidant status of rats. **Nutrients**.2015;7:5905–5915.

KLONGKLAEW A, BANWO K, PORNPIMON ASHISH S, CHARTCHAI C, DIPAYAN K, KALIDAS S. Lactic acid bacteria based fermentation strategy to improve phenolicbioactive-linked functional qualities of select chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. **NFS Journal**. 2022; 27:36-46.

KOUBALA BB. et al. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Ame’liore’e” and “Mango” peels. **Food Hydrocolloids**. 2008;.22:345-1351.

KUMAR M, NAGPAL R, HEMALATHA R, YADAV H, MAROTTA F. Probiotics and Prebiotics for Promoting Health. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 2016;1^o. ed. Italy: Elsevier Inc.75–85.

LARSEN N, CAHÚ TB, SAAD SMI, BLENNOW A AND 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**. 2018;74:11-20.

LI R, ZHAN POLK, DB, TOMASULA PM, YAN F, LIU L. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. **Journal of Controlled Release**. 2016;230:79-87.

LIEW SL, ARIFF AB, RAHA AR, HO YW. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**. 2005;102:137-142.

LILLO-PEREZ S, GUERRA-VALLE M, ORELLANA-PALMA P, PETZOLD G. Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. **Food Science And Technology**.2021;151:112106.

LIMA GC, VUOLO MM, BATISTA AG, DRAGANO NRV, SOLON C, JUNIOR MRM. *Passiflora edulis* peel intake improves insulin sensitivity, increasing incretins and hypothalamic satietogenic neuropeptide in rats on a high-fat diet. **Nutrition**. 2016;32:863-870.

LIN Y, AN F, HE H, GENG F, SONG H, & HUANG Q. Structural and rheological characterization of pectin from passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel extracted by high-speed shearing. **Food Hydrocolloids**. 2020;106555.

LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA E, COUTINHO PM & HENRISSAT B, The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Reserch**. 2014;42(1):490-495.

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

MAIA PL, FIORI BC, SILVA FR. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arquivos. Catarinenses de Medicina**. 2018;47:182-197.

MANTZOURANI I, KAZAKOS S, TERPOU A, ALEXOPOULOS A, BEZIRTZOGLU E, BEKATOROU A, et al. Potential of the probiotic *Lactobacillus Plantarum* ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice. **Foods**. 2019;8(1), 4.

MANTZOURANI I, TERPOU A, ALEXOPOULOS A, BEZIRTZOGLU E, BEKATOROU A & PLESSAS, S. Production of a potentially synbiotic fermented Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) beverage using *Lactobacillus paracasei* K5 immobilized on wheat bran. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2019;17:347–351.

MARIĆ, M, GRASSINO AN, ZHU Z, BARBA FJ, BRNČIĆ M, & RIMAC BRNČIĆ S. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. **Trends in Food Science & Technolog**.2018;76:28–37.

MARKETS AND MARKETS. Dairy Alternatives Market by Source (Soy, Almond, Coconut, Rice, Oats, Hemp), Application (Milk, Cheese, Yogurt, Ice Creams, Creamers), Distribution Channel (Supermarkets, Health Stores, Pharmacies), Formulation and Region – Global Forecast to 2025.

<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/dairy-alternative-plant-milk-beverages-market-677.html>. (Accessed 1 August 2020).

MATEOS-APARICIO, I, JIMÉNEZ DE LA PEÑA R, PÉREZ-CÓZAR ML, RUPÉREZ P, REDONDO-CUENCA A, & VILLANUEVA-SUÁREZ MJ. Apple by-product dietary fibre exhibits potential prebiotic and hypolipidemic effects in high-fat fed Wistar rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. 2020;100219.

MATHIPA-MDAKANE & THANTSHA, M. S. Review *Lactocaseibacillus rhamnosus*: A Suitable Candidate for the Construction of Novel Bioengineered Probiotic Strains for Targeted Pathogen Control Moloko G. **Foods**. 2022;11:785.

MELETTI LMM, BRÜCKNER CH. Melhoramento Genético de Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2001;345-385.

MENDES RML, ANDRADE RHC, MARQUES MFF, ANDRADE ER. Potential use of the passion fruit from caatinga in kefir. **Food Bioscience**. 2021;39:100809.

MESQUITA MC, LEANDRO ES, ALENCAR ER, BOTELHO RBA. Fermentation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and coconut (*Coccus nucifera* L.) beverages by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81: The influence of sugar content on growth and stability during storage. **LWT – Food Science and Technology**. 2020;132:109834.

MINJARES-FUENTES R, FEMENIA A, GARAU MC, MEZA-VELÁZQUEZ JA., SIMAL S & ROSSELLÓ C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**. 2014;106:179–189.

MOORTHY IG, MARAN JP, SURYA SM, NAGANYASHREE S, & SHIVAMATHI C. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2015;72:1323–1328.

MUNARIN F, TANZI MC & PETRINI P, Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal Biological Macromolecules**. 2012;51:681-689.
NAQASH F, MASOODI FA, RATHER SA, WANI SM & GANI A. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin – A Review. **Carbohydrates Polymers**. 2017;168:227–239.

NAZARRO F, FRATIANNI F, NICOLAUS B, POLI A & ORLANDO P, The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**.2012;18(3):80–285.

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

NGUYEN BT, BUJNA E, FEKETE N, TRAN A, REZESSY-SZABO J M, PRASAD R, et al. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Frontiers in Nutrition**. 2019;6:54.

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

OLIVEIRA JÚNIOR MX, SÃO JOSÉ AR, REBOUÇAS TNH et al. Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* MAST.) **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2010;32(2):584-590.

PAIXÃO LA, CASTRO FFS. Colonization of the intestinal microbiota and its influence on health host. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília. 2016;14-85-96.

PANDA SK, KELLERSHOHN J, RUSSEL I. Introduction and overview. Chapter 1, **Probioc Beverages**. Academic Press 2021.

PARKAR SG, REDGATE EL, WIBISONO R, LUO X, KOH ETH, SCHRODER R. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. **Journal of Functional Foods**.2010; 2: 210-218.

PEREIRA AD, CORRÊAR X, OLIVEIRA AC. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of “somnus” passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**. 2015;59:12-21.

PIMENTEL TC, COSTA WKA, BATÃO CE, ROSSET M, MAGNANI M. Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**. 2021;140:110033.

PINHEIRO ER, SILVA IMDA, GONZAGA LV, AMANTE ER, TEOFILLO RF, FERREIRA MMC, AMBONI RDMC. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. **Biores Technologies**. 2008;99:5561-5566.

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

PRANDI B, BALDASSARRE S, BABBAR N, BANCALARI E, VANDEZANDE P, HERMANS D, & SFORZA S. Pectin oligosaccharides from sugar beet pulp: Molecular characterization and potential prebiotic activity. **Food function**.2018; 9(3): 1557-1569.

RAES K, KNOCKAERT D, STRUIJS D, VAN CAMP J, Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and anti-nutritional factors in the plant. **Trends in Food Science & Technology**.2014;31(1):32-41.

RAMAIVA SD, BUJANG JS, SAUPI N. Nutritional, mineral and organic acid composition of passion fruit (*Passiflora species*). **Food Research**. 2019;3(3):231-240.

RAMOS AT, CUNHA MA, SAABA-SRUR A & PIRES VCF. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 2007;17(4):592-597.

RANADHEERA RDCS, BAINES SK, & ADAMS MC. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**. 2019;43(1):1–7.

RASMUSSEN HE, HAMAKER BR. Prebiotics and inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinical North America**. 2017;46(4):783-795.

REALE A, DI RENZO T, ROSSI F, ZOTTA T, IACUMIN L, PREZIUSO M, PARENTE E, SORRENTINO E, COPPOLA R. Tolerance of *Lactobacillus casei*; *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT-Food Science and Technology** 2015;60:721–728.

RINALDI MM et al. Postharvest quality and shelf life of *Passiflora cincinnata* BRS Sertão Forte fruits according to type of fertilization and storage. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2022;44.

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

SANTOS EKR, AZOUBEL PM, GOUVEIA ER. Better Pectin Yield From Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): From Shaker or Ultrasound? A Comparison. **Waste Biomass**. 2015;1-6.

SANTOS RTS. et al. Physicochemical characterization, bioactive compounds, in vitro antioxidant activity, sensory profile and consumer acceptability of fermented alcoholic beverage obtained from Caatinga passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.). **LWT**. 2021;148:111714.

SEIXAS FL, FUKUDA DL, TURBIANI FRB et al. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**. 2014;38:186-192.

SHI T, ARYANTINI NPD, URASHIMA T, FUKUDA K, NISHIYAMA K, NAKAMATA K; YAMAMOTO Y, MUKAI T, MIKUMO D, ODA, Y et al. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains from traditional fermented mare milk produced in Sumbawa Island of Indonesia. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 2012;76:1897–1903.

SLEATOR RD, & HILL C. “Bioengineered Bugs” – A patho-biotechnology approach to probiotic research and applications. **Medical Hypotheses**. 2008; 70(1): 167–169.

STEWART CJ, AJAMI NJ, O'BRIEN JL, HUTCHINSON DS, SMITH DP, WONG MC, PETROSINO JF. Temporal Development of the Gut Microbiome in Early Childhood from the TEDDY Study. **Nature**. 2018;562(7728):583-58.

SUNNY-ROBERTS EO, KNORR D, Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. **Food Microbiology** 2008;25:183–189.

TABOADA E, FISHE P, JARA R, ZUNIGA E, GIDEKEL M, CABRERA JC, PEREIRA, E, GUTIERREZ-MORAGA A, VILLALONGA R, GUSTAVO CABRERA G. Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. **Food Chemistry**. 2010;123:669-678.

TARIFA MC. et al. Symbiotic pectin microparticles with native Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) enhance *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* survival. **Revista Argentina de Microbiología**, 2021.

TAYLOR JRN, WRIGLEY H, CORKE H, SEETHARAMAN K, FAUBION J. Fermentation foods and nonalcoholic beverages. **Encyclopedia of Food Grains**. 2.ed, Oxford: Academic Press. 2016:183–192.

TERPOU A et al. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**. 2019;11(7):1591.

THAISS CA, ZEEVI D, LEVY M, ZILBERMAN-SCHAPIRA G, SUEZ J, TENGELER, AC, et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. **Cells**. 2014;159(3): 514-529.

TIAN L, BRUGGEMAN G, VAN DEN BERG M, BOREWICZ K, SCHEURINK AJ, BRUININX E, ... & GRUPPEN H, Effects of pectin on fermentation characteristics, carbohydrate utilization, and microbial community composition in the gastrointestinal tract of weaning pigs. **Molecular Nutrition & Food Research**. 2017;61(1):1600186.

VALERO-CASES E, & FRUTOS MJ. Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**. 2015;64(2):824–828.

VANDENPLAS Y, HUYS G, DAUBE G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**. 2015; 91(1)6–21.

VIDHYASAGAR V & JEEVARATNAM K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. **Journal of Functional Foods**. 2013;5(1):235–243.

WALSH CJ, GUINANE CM, O'TOOLE PW, & COTTER PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Letters**. 2014;588(22):4120–4130.

WANG, YAQI et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. 2021; 9.

XI JUN, LI ZONGMING, FAN YANG. Recent advances in continuous extraction of bioactive ingredients from food-processing wastes by pulsed electric fields. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2020;1-13.

XIONG T, LI X, GUANQ, PENG Q, GUAN Q, PENG XIE M. Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: Growth, acidification and metabolic analyses. **Food Control**. 2014;41:122-127.

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

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

YOON K, WOODAMS E, HANG Y. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**. 2006;97:1427-1430.

ZHANG W, XU P, ZHANG H. Pectin in cancer therapy: A review. **Trends in Food Science and Technology**. 2015;44:258-271.

ZHENG J, WITTOUCK S, SALVETTI E, FRANZ CMAP, HARRIS HMB et al. Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **Internatonal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2020;70(4).

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO

Food Bioscience 39 (2021) 100809



Contents lists available at ScienceDirect

Food Bioscience

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

Potential use of the passion fruit from caatinga in kefir

Roberta Maria Lins Mendes^{a,*}, Raissa Holanda Cavalcanti de Andrade^a,
 Maria de Fatima Fonseca Marques^b, Ester Ribeiro de Andrade^c

^a Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

^b BioLogicus, Recife, PE, Brazil

^c Department of Antibiotics – Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Probiotics

Passion fruit juice

*Passiflora edulis**Passiflora cincinnata*

ABSTRACT

The cellular viability, gastrointestinal survival, physical-chemical and sensorial parameters during the refrigerated storage of kefir from Caatinga passion fruit (CPK) was studied. Kefir from yellow passion fruit (YPK) was used as a control. At the end of storage (60 days), the viabilities of bacteria and yeasts were about 6 and 10 Log CFU/mL, respectively. With simulated gastrointestinal conditions, bacteria survival was between 100 and 40% for YPK and between 90 and 70% for CPK. The survival of yeasts remained ~100% for the YPK and it varied between 100 and 70% for the CPK. Consumer purchase intention was slightly higher for YPK although both had reasonable acceptability. Both types of passion fruit could be used to prepare kefir and microorganisms in the beverages remained viable during storage. The sensorial results might suggest that consumers will accept the product.

1. Introduction

Probiotic bacteria cultures may have a positive influence on the human gastrointestinal tract due to the health benefits of these microorganisms (Kerry et al., 2016). Lactic fermentation is generally associated with milk or dairy products; however, the development of non-dairy probiotic products, including those with a fruit-based food matrix, has been stimulated by the increase in the number of individuals with lactose intolerance (Corona et al., 2016; Farias et al., 2016; Florda et al., 2017; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

The application of fruits as substrate for lactic fermentation also has the advantage of incorporating specific flavors and different nutrients for each type of fruit, resulting in products with different sensorial and physicochemical characteristics (Sagdic et al., 2014).

Kefir was originally made from mare milk by the people of the Caucasus and traditionally prepared using fermentation of milk in bags made from rawhide or the stomach of animals (Lopitz-Otsoa et al., 2006). The results are a viscous beverage, refreshing, with a slightly acid and spicy taste, produced using kefir grains (Corona et al., 2016; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Marsh et al., 2013.). Kefir consists of a probiotic consortium, of bacteria and yeasts probiotic species that develop in harmony. Other substrates besides milk such as water with sucrose added or fruit extracts can be used for grain maintenance (Farnworth,

2005). Kefir may be classified as a functional food due to its reported beneficial effects on the human health. (Florda et al., 2017; Zanirati et al., 2015).

Passion fruit species belong to the Passifloraceae family, with cultivation throughout Latin American, and they are of considerable economic importance to Brazil. The specie *Passiflora edulis*, known as yellow passion fruit, is the principal commercially explored and cultivated specie throughout Brazil. However, other species including the *Passiflora cincinnata* (passion fruit from Caatinga), a region of desert vegetation are less exploited, although it is a native of Brazilian northeast and represents another fruit variety with potential for commercialization (Farias et al., 2016; Santos et al., 2017). This species is resistant to drought as well as some of the pests that affect the YPK. It is rich in potassium, iron, phosphorus, calcium, and B complex, A and C vitamins (Araujo et al., 2002).

Studies on the use of passion fruit for elaboration of probiotic beverages are limited. Two recent studies have evaluated the use of CPK as a vehicle for probiotic beverages with or without the addition of probiotics (Farias et al., 2016; Santos et al., 2017). Both studies have shown that this variety is promising for probiotic beverages using *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. This study will evaluate cellular viability, gastrointestinal survival, physical-chemical and sensorial parameters during the refrigerated storage of CPK.

* Corresponding author. Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-901, Brazil.
 E-mail address: roberta.mendes@ufpe.br (R.M.L. Mendes).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100809>

Received 23 July 2019; Received in revised form 16 November 2020; Accepted 17 November 2020

Available online 30 November 2020

2212-4292/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2. Material and methods

2.1. Passion fruit species

CPK was kindly provided by a production cooperative in Tapiramutá, state of Bahia, Brazil; while the YPK was purchased at an organic fair in the Northern Zone of Recife, state of Pernambuco, Brazil. The greenish (Caatinga passion fruit) and yellowish (yellow passion fruit) fruits collected with the ideal degree of maturity were selected. The ones that had any physical damages were not used. The remaining fruit were washed with water and liquid soap (Valença Química, Recife, Pernambuco, Brazil) and manipulated for the pulp extraction. The fruits from the passion fruit plant were cut with a knife and using a strainer the raw pulp was separated from the seed. Peels and seeds were put away. The pulp was conserved in a freezer (Electrolux, model DC49A, Recife, Pernambuco, Brazil) at -20°C for a maximum of 3 wk.

2.2. Production of kefir

The juice was processed to obtain an approximate value of 14° Brix (Refractometer Ausjena model 1, Zeiss, Oberkochen, Germany). The initial fermentation was carried using as the inoculum the symbiotic lyophilized powder of kefir (BioLogicus Co., Recife, PE, Brazil) in a series of flasks containing the juices for 15 days for maturation at a temperature of 4.0°C in accordance with the methodology - Patent Pending (Marques et al., 2014). At the end of the fermentation, the mean values of $^{\circ}\text{Brix}$ 9.6 (YPK) and 9.4 (CPK) were obtained with pH values of 3.50 and 3.49, respectively.

The beverages were stored in PET bottles of 500 ml, closed hermetically, and kept refrigerated (between 0 and 5°C) until the time of analyses. Considering zero time ($t = 0$) as the moment when the kefir was ready. The other analyses were made after 30 and 60 days of storage.

2.3. Determination of organic acids, carbohydrates and ethanol

Organic acid (citric, malic and lactic) concentrations were determined at 0, 30 and 60 days using high performance liquid chromatography (HPLC) in a Shimadzu system (Model Prominence LC-20AD, Kyoto, Japan) equipped with a quaternary pump coupled to a degasser (model DGU-20A5r), an auto-sampler and a diode array detector (model SPD-M20A). The software used for data acquisition was LC Solutions (Shimadzu Corp.). An ionic exchange column (Aminex® HPX-87H, BioRad, Hercules, CA, USA), 30×0.78 cm, with a $9 \mu\text{m}$ particle size, was used. The mobile phase used was H_2SO_4 5 mM at 0.6 ml/min and 29°C . Carbohydrates (glucose and fructose) and ethanol were determined using the same column system but with a refractive index detector and at 60°C .

The samples were filtered with a $0.22 \mu\text{m}$ membrane (Merck, Darmstadt, Germany) and diluted in the mobile phase at a 1:10 ratio. Different volumes of standards of organic acids (1, 3, 6, 10, and $20 \mu\text{l}$), carbohydrates and ethanol (10, 15, 20, 25 and $30 \mu\text{l}$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1 g/L were put through the HPLC to obtain each linear calibration curve and correlation coefficients (R^2) of all calibration curves were ≥ 0.999 . The retention times of the standards and their peak area were used to identify and quantify the compounds. The data were obtained using the software LabSolutions that came with the instrument.

2.4. Cell viability

Serial dilutions of kefir in a saline solution 0.9% (w/v) were used for viable cell counts. Aliquots of 0.1 ml of the diluted samples were plated, in triplicate, on MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) (Merck) containing cycloheximide (Sigma-Aldrich) (200 mg/l) to quantify lactic acid bacteria (LAB), the largest group of bacteria belonging to the kefir

microbiota among which the dominant genera were *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Lactococcus* (Magalhães et al., 2011; Puerari et al., 2012; Sabokbar and Khodaiyan, 2014) and Saboraud (Kasvi, Paraná, Brazil) containing chloramphenicol (Sigma-Aldrich) (100 mg/l) to quantify yeast (spread plate method). The plates were incubated at 37°C for 48 h. Plates containing between 30 and 300 colonies were count to determine colony forming units (CFU)/ml of solution.

2.5. Survival of bacteria and yeasts with simulated gastrointestinal conditions

The determination of survival of LAB and yeasts in each kefir was based on the method described by Santos et al. (2017), at 0, 30 and 60 days. To simulate the gastric phase, the pH of beverages was adjusted to 2 using HCl (1 M) (Dinâmica, São Paulo, Brazil). Pepsin (Dinâmica), which was added to samples to a concentration of 3 g/l. Flasks were incubated at 37°C and agitated at 150 rpm (Tecnal, TE model -422, Piracicaba, São Paulo, Brazil) for 2 h. The pH was adjusted to 5, using an alkaline solution (150 ml) 1 M NaOH in 14 g/l NaH_2PO_4 (Alphatec, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil). Bile salts (HiMedia, Mumbai, India) and pancreatin (Éxodo Científica, Hortolândia, São Paulo, Brazil) were added to 10 and 1 g/l, respectively. Samples were incubated as above at 37°C and agitated at 150 rpm for 2 h (enteric phase 1). The pH was adjusted to 7 using the same alkaline solution and the bile salts and pancreatin concentrations were back to (10 and 1 g/l, respectively). The samples were incubated as above under the same conditions for 2 h (enteric phase 2). Cell viability was determined (item 2.4) at the beginning and after 6 h. Cell survival was calculated in the initial and at the end of storage according to equation (1).

$$S = \frac{\text{Log CFU } N_6}{\text{Log CFU } N_0} \times 100 \quad (1)$$

Where:

S = survival rate (%)

N_6 = the total viable count after exposure to simulated gastrointestinal conditions (6 h)

N_0 = the total viable count before exposure to simulated gastrointestinal conditions (0 h).

2.6. Sensory evaluation

The sensorial evaluation was carried out using the two types of kefir after 60 days of storage, with 100 non-trained panelists that were students, faculty and staff (74 female and 26 male with an age range of 18–45 yr) of the Federal University of Pernambuco (Recife, PE, Brazil) that agreed to participate after an invitation and explanation of the test. The samples were served cold ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) in disposable glasses randomly coded with three-digit numbers and the order of presentation was randomized. Partitioned booths with fluorescent lighting were used for evaluation. Water was provided to clean the tester's palate between sampling sessions. Acceptability and buying intention of products were evaluated, using two hedonic scales: the first had a 9 point scale, varying from 1 (extremely dislike) to 9 (really liked), the second had 7 points varying from 1 (would never buy) to 7 (would buy very often). The evaluations were carried out at the Dietetic Technics Laboratory of the Department of Nutrition. This study was done in accordance with the ethical guidelines established by Brazilian legislation for research using humans and was registered with the Brazilian Ministry of Health (Approval number: 2.264.487).

2.7. Statistical analysis

The mean values of cell viability were obtained from triplicates and the other analyses from duplicates. Data were analyzed using one-way

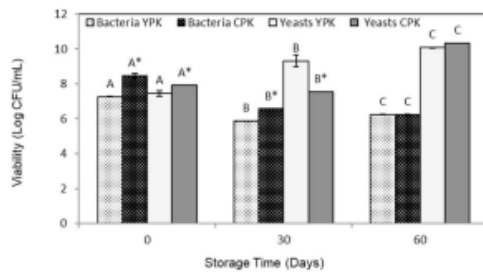


Fig. 1. Viability of bacteria and yeasts in yellow passion fruit kefir (YPK) and Caatinga passion fruit kefir (CPK), during storage. The different letters (A, B, C, D, E and F) indicate that there was a significant difference in each type of kefir over time ($P \leq 0.05$); asterisk denotes significant differences ($P \leq 0.05$) between YPK and CPK.

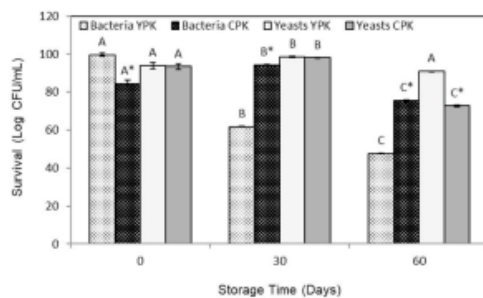


Fig. 2. Survival of bacteria and yeasts in yellow passion fruit kefir (YPK) and Caatinga passion fruit kefir (CPK), with simulated gastrointestinal conditions. The different letters (A, B, C, D, E and F) indicate that there was a significant difference in each type of kefir over time ($P \leq 0.05$); asterisk denotes significant differences ($P \leq 0.05$) between YPK and CPK.

analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test assuming $P \leq 0.05$, using software OriginPro 8.0 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Cell viability and survival with simulated gastrointestinal conditions

Bacterial viability (Fig. 1a) decreased during storage for both kefirs, CPK had 73.8% and YPK had 86.1% survival. The fruit kefirs had been matured at low temperature for 15 days before the initial analyses and it is possible that the bacterial flora between the two kefirs was different in numbers and species. There was a statistical difference between the bacterial viability of the kefirs after 30 days. There was no statistical difference between the viabilities at 60 days, even though the storage of the CPK started with a higher concentration of bacteria. Yeasts viability increased during the storage (Fig. 1b). After 60 days of storage, yeast viability increased more for YPK than CPK but both were about the same final CFU.

At the initial time of storage 99.5% bacteria survived in the YPK; at 30 and 60 days, however, the survival declined significantly to ~60 and 50%, respectively. The survival in the CPK was ~80% at the initial time of storage and it had increased significantly by 30 days and reached 75% at 60 days. During all storage times, the survival of bacterium was statistically different between the YPK and CPK (Fig. 2a). Although LAB usually do not tolerate high concentrations of bile salt, other studies were consistent with the current study, using the same bile salt

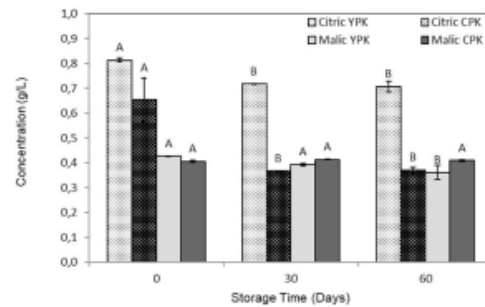


Fig. 3. Citric and malic acid concentrations in yellow passion fruit kefir (YPK) and Caatinga passion fruit kefir (CPK) during storage. The different letters (A and B) denote significant differences ($P \leq 0.05$) between these acids.

concentration to evaluate the tolerance of *L. Rhamnosus* ATCC 7469 simulating the conditions of the gastrointestinal tract (Andrade et al., 2019; Santos et al., 2017). The survival of yeast was constant in the YPK and CPK decreased within 60 days (Fig. 2b).

3.2. Physicochemical characteristics

Citric acid concentration of the YPK remained constant during storage and malic acid concentration decreased after 60 days (Fig. 3a). On the other hand, citric acid concentration varied in the CPK (Fig. 3b) and malic acids concentration remained constant throughout storage. These results, however, differed from the study by Farias et al. (2016), who found concentrations of citric and malic acid of 5.8 ± 0.3 and 0.78 ± 0.05 g/L, respectively. However, factors such as the degree of maturation of the fruit and the concentration of the pulp used in the preparation of the beverage may have account for the difference.

Lactic acid was not found in the YPK and was low in the CPK initially and remained low during storage. Magalhães et al. (2010) reported that yeasts from the genus *Kazachstania* present in kefir could be related to the assimilation of some acids produced by LAB. *Kluyveromyces marxianus* showed strong activity in an acid medium; besides, this yeast consumed lactic acid and produced ethanol and CO_2 (Zhou et al., 2009). *Saccharomyces cerevisiae* can also reduce the lactic acid concentration (Magalhães et al., 2010). Florda et al. (2017) reported on the diversity of microorganisms found in kefir grains, suggesting that strains may vary according to the site that was used for growth. However, *K. marxianus* and *S. cerevisiae* are almost always found in kefir, both in water and milk worldwide. Zanirati et al. (2015) also mentioned yeasts more commonly found in kefir, such as the genus *Kluyveromyces*, *Kazachstania* and *Saccharomyces*, whose presence may explain the low levels of lactic acid.

The concentrations of ethanol ranged from 2.2 to 3.4% (v/v) in the YPK and from 1.6 to 2.0% (v/v) in the CPK with the storage; results consistent with those found by Randazzo et al. (2016), who reported concentrations of 2.67% (v/v) in apple juice kefir, 1.3% (v/v) in kiwi and 2.31% (v/v) in pear kefir after 48 h of fermentation. The ethanol concentration of kefir varied from 0.01 to 2.5% (m.v⁻¹) depending on the starter and the method used to prepare the kefir (Beshkova et al., 2003; Magalhães et al., 2011). Ethanol is formed during the conversion of acetaldehyde to ethanol by alcohol dehydrogenase, an enzyme present in both yeasts and *Lactobacillus* (Guzel-Seydim et al., 2000). Yeasts and *Leuconostoc* are considered the principal producers of ethanol. However, because no ethanol is produced during co-metabolism of lactose and citrate by *Leuconostoc*, yeasts are the main ethanol producers (Guzel-Seydim et al., 2000; Simova et al., 2002). *S. cerevisiae* is the main yeast from kefir that produces ethanol (Pereira et al., 2010).

Other studies involving kefir showed lower ethanol levels (Magalhães et al., 2010, 2011). Güzel-Seydim et al. (2000) reported that final

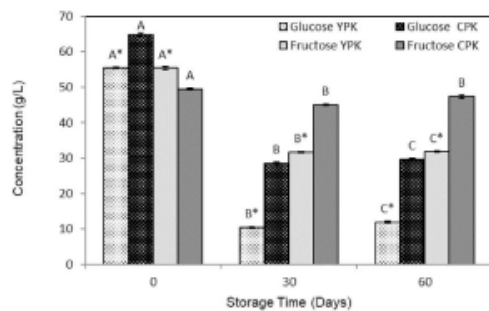


Fig. 4. Glucose and Fructose concentrations in yellow passion fruit kefir (YPK) and Caatinga passion fruit kefir (CPK) during storage. The different letters (A, B and C) denote significant differences ($P \leq 0.05$); asterisk denotes significant differences ($P \leq 0.05$) between YPK and CPK.

fermentation products like ethanol and CO_2 are important because they are responsible for the taste and aroma of kefir. Beshkova et al. (2003) reported that the alcohol content should be enough to give kefir a typical light alcoholic flavor.

Glucose and fructose showed higher concentrations at the initial time of storage, Fig. 4a and b, respectively. During the storage, these carbohydrates were used for ethanol production in CPK. On the other hand, in the YPK, the concentration of ethanol did not increase. Probably in the YPK the consumption of sugars was only for growth of the microorganisms. After 60 days of storage, the concentration of glucose remaining was 10 and 30 g/l in the YPK and CPK, respectively; and the concentration of fructose was 30 and 50 g/l for both beverages. It probably was due to storage temperature, which prevented the appropriate conditions for fermentation and allowed a dominance of microbial metabolism.

3.3. Sensory attributes

There were no studies on the sensory acceptance of the passion fruit of the Caatinga in any application. Despite the higher concentrations of glucose and fructose in CPK, sensory analysis showed a greater

preference for YPK (Fig. 5a). The results for CPK, indicated that this beverage was not rejected. According to Araujo et al. (2002) Caatinga passion fruit has a longer, sweeter and less acidic flavor than yellow passion fruit, sensory attributes that are usually better accepted by the population. However, the preference may be justified by the popularization of yellow passion fruit.

The results for the intention of purchase may reflect the usual low consumption of this type of product, as well as lack of knowledge about the Caatinga passion fruit (Fig. 5b). Kefir has an unusual characteristic taste, and lack of experience with about fermented products may induce its rejection, since the population usually associate carbonated drinks with more popular consumed and sugar-rich soft drinks. In a study done with cancer survivors after physical exercise, the acceptance of the same kefir was greater after individuals were informed about the benefits of the drink to promote health, increasing approval from 75 to almost 89% (O'Brien et al., 2017).

The use of low cost fruits like passion fruit, especially the passion fruit from Caatinga, after the popularization of a fruit that generates income from the producers facing a hard economic scenario would be beneficial. The present study represents another potential use of this fruit which is different from the kefir formulations studied by Farias et al. (2016) and Santos et al. (2017). In the future, with the higher consumption of this type of beverage associated with many benefits to health, along with being a non-dairy probiotic product might make it an acceptable commercial product.

4. Conclusions

Both types of passion fruit have been shown to be reasonable vehicles for the production of kefir. YPK showed higher survival of yeasts during the storage, unlike the bacteria that decreased during the storage. Taking into account the reductions in survival after the simulated GIT conditions, bacteria and yeasts maintained the highest stability in CPK with survival always $>70\%$. Sensory analysis showed a reasonable acceptance of the kefir beverage, and the tasters showed a greater acceptance and intent to purchase for YPK.

Author Contribution Statement:

Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation;

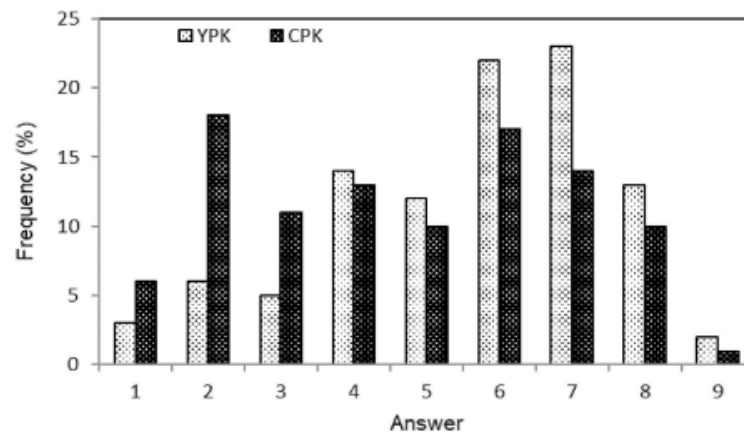


Fig. 5a. Frequency of satisfaction responses for YPK and CPK. 1- Disliked (extremely), 2- Disliked a lot, 3- Disliked moderately, 4- Disliked slightly, 5- Disliked/liked, 6- Disliked slightly, 7- Disliked moderately, 8- Disliked a lot 9- Disliked (I loved it).

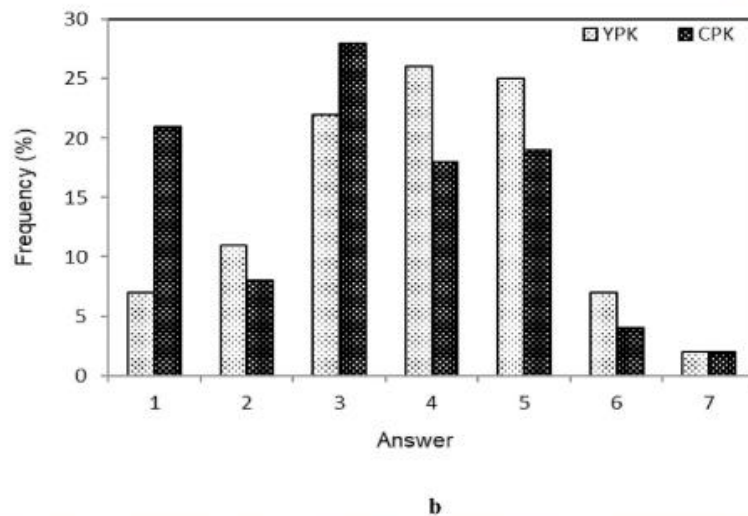


Fig. 5b. Frequency of responses to purchase intent for YPK and CPK. 1- Never buy, 2- Would not buy, 3- Buy if there was no other, 4- Buy if it was affordable, 5- Buy, 6- Buy often, 7- Buy very often.

Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing – original draft; Writing – review & editing.

Conceitualização; Curadoria de dados; Análise formal; Aquisição de recursos; Investigação; Metodologia; Administração de projetos; Recursos; Programas; Supervisão; Validação; Visualização; Funções / Redação - rascunho original; Redação - revisão e edição.

Declaration of competing interest

We declare that there are no conflicts of interest between the authors of the article entitled: “Potential use of the passion fruit from caatinga in kefir” submitted for review in *Food Bioscience*.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília DF, Brazil (CNPq). The English text of this paper was revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT – Master of Arts in Teaching (The Johns Hopkins University), RSAAdip – TESL (Royal Society of the Arts Diploma in Teaching English as a Second Language) (Cambridge University).

References

- Andrade, R., Santos, E., Azoubel, P., & Ribeiro, E. (2019). Increased survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in guava juices with simulated gastrointestinal conditions during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 32, 100470.
- Andr  o, F. P., Santos, C. A. P., Silva, G. C., & Assis, J. S. (2002). Caracteriza  o de frutos de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). In *At the national Congress of bot  nica, north west bot  nica reunion, Recife, PE, Brasil*. In Portuguese.
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., & Dimitrov, Z. H. P. (2003). Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 13(7), 529–535.
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., Moschetti, G., & Settanni, L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetables juices. *LWT – Food Science and Technology*, 66, 572–581.
- Farias, N., Soares, M., & Gouveia, E. (2016). Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie: Food Science and Technology*, 71, 149–154.
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology-Bulletin*, 2, 1–17.

- Florda, F. A., Pereira, G. V. M., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation – a review. *Food Microbiology*, 66, 86–95.
- Guzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 35–43.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 927–939.
- Lapitz-Osola, F., Rementera, A., Elgu  zabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Mikologia*, 23, 67–74.
- Magalhães, K. T., Pereira, G. V. M., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 693–702.
- Magalhães, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A., Silva, J. B. A., & Schwan, R. F. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresour. Technology*, 101(22), 8843–8850.
- Marques, M. F. F., Marques, D. N., & Bueno, L. A. (2014). Patent pending - code: BR 10 2014 002784 0 - process for the production of kefir probiotic drink based on natural juices of lemon and fruit. Recife, PE, Brazil: Biologics Co.. In Portuguese.
- Marsh, A. J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PLoS One*, 8(7), 69371.
- O’Brien, E., Boenke, C., Prinyawiwatkul, W., Lisano, J., Shadkelford, D., Reeves, K., Christensen, M., Hayward, R., Carabante Ordonez, K., & Stewart, L. K. (2017). Sensory analysis of a kefir product designed for active cancer survivors. *Journal of Dairy Science*, 100, 4349–4353.
- Pereira, G. M. V., Ramos, C. L., Galv  o, C., Souza Dias, E., & Schwan, R. F. (2010). Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 131–137.
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48, 634–640.
- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germana, M. A., Erten, H., ... Settanni, L. (2016). Development of new non dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 54, 40–51.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1–11.
- Sabokbar, N., & Khodalyan, F. (2015). Characterization of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science & Technology*, 52(6), 3711–3718.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Yapar, N., & Yetim, H. (2014). Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from g  labu  , a traditional Turkish fermented European cranberry bush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Research International*, 64, 537–545.

- Santos, E., Andrade, R., & Gouveia, E. (2017). Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. *Food Bioscience*, 20, 56–61.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T. S., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeast in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Technology*, 28, 1–6.
- Zanirati, D. F., Abatemarco, J. R. F., De Cicco, S. H., Sandes, S. H. C., Nicoll, J. R., Cantini, J. N., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70–76.
- Zhou, J., Liu, X., Jiang, H., & Dong, M. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26(8), 770–775.