



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

JAMILE COUTINHO COELHO

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA A PARTIR
DO SUCO DE LARANJA FERMENTADO COM
*Lactobacillus casei***

FORTALEZA

2009

JAMILE COUTINHO COELHO

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA A PARTIR
DO SUCO DE LARANJA FERMENTADO COM
*Lactobacillus casei***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2009

JAMILE COUTINHO COELHO

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA A PARTIR
DO SUCO DE LARANJA FERMENTADO COM
*Lactobacillus casei***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Sueli Rodrigues

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Maria Correia da Costa

Universidade Federal do Ceará - Membro

Dr. Edy Sousa de Brito

Embrapa Agroindústria Tropical – Membro

Aos meus pais,
pelo incentivo, amor e por acreditarem
incondicionalmente nas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ajudar a fazer sempre as melhores escolhas e por me colocar no lugar certo, na hora certa, com as pessoas certas.

Ao meu noivo Rodrigo Novaes, por compreender que, algumas vezes, uma bactéria demanda mais atenção e cuidados do que um ser humano.

À minha orientadora Dra. Sueli Rodrigues, inteligente, prática e competente, por ter acreditado que uma nutricionista poderia dar bons frutos em biotecnologia.

Aos membros da banca, Dr. José Maria Correia da Costa e Dr. Edy Sousa de Brito por aceitarem o convite e enriquecerem este trabalho desde o tempo em que ele ainda era um projeto.

À professora Deborah Garruti, por ceder o Laboratório de Análise Sensorial da Embrapa e pela imensa colaboração na análise sensorial do suco.

Aos membros do LABIOTEC, pela amizade e ensinamentos. Especial agradecimento à Mariana Santiago, por ter me introduzido ao mundo dos *Lactobacillus*; à Cláudia Fontes, pelas incontáveis horas no HPLC e ao Tiago Albuquerque, por ter sido vital a todas as etapas deste trabalho.

Aos meus comandantes da Base Aérea de Fortaleza- Força Aérea Brasileira, Cel Silva Júnior, Cel Alípio, Cap Newton e Ten Iacyara, por terem compreendido a minha não rara ausência em prol do meu crescimento intelectual e acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por viabilizar a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Alimentos funcionais, que além de nutrientes básicos oferecem algum efeito benéfico à saúde do consumidor, têm tido um grande crescimento no mercado. Nesse contexto, destacam-se os produtos probióticos, contendo micro-organismos que conferem diversos benefícios ao organismo humano, principalmente ao trato gastrointestinal. As fontes de probióticos são muito restritas aos produtos lácteos, limitando o consumo desses micro-organismos, pois algumas pessoas não podem ou não apreciam consumir leites e derivados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei* NRRL B-442. Foi utilizado suco de laranja concentrado sem adição de conservantes e açúcar, na diluição de 1:7. Um planejamento experimental, no qual foram variados pH (4,7 a 6,7) e temperatura de fermentação (15 a 37°C), foi executado. O suco foi fermentado por 20 h e após a fermentação foi armazenado por 42 dias a 4°C. O pH e a temperatura de fermentação onde o *L. casei* apresentou máxima viabilidade foi 6,0 e 30°C, respectivamente. Esses valores foram utilizados para a elaboração do suco de laranja final, que foi analisado a cada 2h durante a fermentação e semanalmente durante a estocagem. Ao longo da fermentação e da estocagem foram avaliados: crescimento, viabilidade, pH, cor, açúcares e ácidos orgânicos. Após a fermentação e a estocagem ocorreu redução do teor de açúcares e do pH como consequência da produção de ácido lático pelo micro-organismo. Apesar dessa redução, houve crescimento do *L. casei* e a sua viabilidade manteve-se acima de 9 Log UFC/mL (10^9 UFC/mL) ao final de 42 dias de estocagem. O suco elaborado nas condições otimizadas foi avaliado sensorialmente. A aceitação do suco sem açúcar, com sacarose e com estévia foi, respectivamente, 65, 84 e 64%. De acordo com as médias hedônicas, não houve diferença significativa na aceitação do suco com sacarose e estévia, no entanto, esses dois sucos diferenciaram-se significativamente do suco não adoçado. Conclui-se que o suco de laranja apresenta grande potencial para tornar-se um novo alimento probiótico, uma vez que propiciou elevado crescimento e viabilidade do *L. casei* sem comprometer a qualidade sensorial do produto, principalmente se for utilizado um agente edulcorante em sua elaboração.

Palavras-chave: probiótico, *Lactobacillus casei*, suco de laranja, fermentação.

ABSTRACT

Functional foods, which in addition to basic nutrients offer some beneficial effect on consumer health, have had a great growth in the food market. In this context, are outstanding the probiotics products containing microorganisms which confer numerous benefits to the human body, especially to the gastrointestinal tract. The sources of probiotics are very restricted to dairy products, limiting the consumption of these microorganisms, because some people can't or don't appreciate to consume dairy products. In this way, the aim of this study was to elaborate a probiotic beverage from fermented orange juice with *Lactobacillus casei* NRRL B-442. Concentrated orange juice without adding preservatives and sugar in dilution 1:7 was used. An experimental design changing pH (4.7 to 6,7) and fermentation temperature (15 to 37°C), was carried out. The juice was fermented for 20 h and after the fermentation it was stored by 42 days at 4 °C. The pH and fermentation temperature where the *L. casei* presented maximum viability was 6.0 and 30 °C, respectively. These values were used for the elaboration of final orange juice, which was examined at each 2h during fermentation and weekly during storage. Along the fermentation and storage have been assessed: growth, viability, pH, color, organic acids and sugars. After fermentation and stocking, pH reduction occurred as a consequence of latic acid production by micro-organism. Despite this reduction, there was growth of *L. casei* and its viability remained above 9 Log CFU/ml (10^9 CFU/mL) at the end of 42 days restocking. The orange juice prepared in optimized conditions was sensorial evaluated. The acceptance of juice without sugar, with sugar and with stevia was, respectively, 65, 84 and 64%. According to the hedonic means, there was no significant difference in the acceptance of juice with sugar and stevia, however, these two juices differ significantly from unsweetened juice. The orange juice showed great potential to become a new probiotic food, since it provided high growth and viability of *L. casei* without compromising the quality of the product.

Keywords: Probiotic; *Lactobacillus casei*; Orange juice; fermentation.

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1.	Ensaio do Planejamento Experimental.....	37
Tabela 2.	Crescimento (g/L) do <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442 em suco de laranja após 24 h de fermentação.....	43
Tabela 3.	Viabilidade (Log UFC/mL) do <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442 em suco de laranja após 24 h de fermentação no suco de laranja.....	44
Tabela 4.	Análise de variância para o crescimento (g/L) do <i>L. casei</i> em suco de laranja fermentado (Eq. 02).....	45
Tabela 5.	Análise de variância para a viabilidade (Log UFC/mL) do <i>L. casei</i> em suco de laranja fermentado (Eq. 03).....	45
Tabela 6.	Crescimento (g/L) e viabilidade (Log UFC/mL) do <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442 em suco de laranja após estocagem a 4°C por 45 dias.....	48
Tabela 7.	Biomassa (g/L) do <i>L. casei</i> e pH do suco de laranja durante 24 h de fermentação de acordo com quantidade de inóculo.....	50
Tabela 8.	Biomassa (g/L) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo das 20 h de fermentação do suco de laranja otimizado.....	52
Tabela 9.	Biomassa (g/L) e viabilidade (Log UFC/mL) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo do armazenamento do suco de laranja fermentado sob refrigeração.....	54
Tabela 10.	Concentração (g/L) de açúcares no suco de laranja com <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo das 20 h de fermentação.....	57
Tabela 11.	Percentual de açúcares do suco de laranja ao longo da fermentação a 30°C.....	58
Tabela 12.	Concentração de açúcares do suco de laranja fermentado ao longo da estocagem sob refrigeração.....	59

Tabela 13.	Percentual de açúcares do suco de laranja fermentado ao longo da estocagem sob refrigeração.....	60
Tabela 14.	Concentração de ácido láctico (g/L) e pH do suco durante a fermentação do suco de laranja com <i>L. casei</i> NRRL B-442.....	61
Tabela 15.	Concentração de ácido láctico (g/L) e pH do suco ao longo do armazenamento do suco de laranja fermentado com <i>L. casei</i> NRRL B-442.....	63
Tabela 16.	Concentração (mg/L) de ácido ascórbico e percentual de perda da vitamina ao longo do armazenamento do suco de laranja fermentado com <i>L. casei</i> NRRL B-442.....	65
Tabela 17.	Coordenadas de cor no suco de laranja fermentado ao longo do tempo de estocagem.....	68
Tabela 18.	Resultados da percentagem de rejeição, indiferença e aceitação e teste de Tukey de suco de laranja fermentado com e sem edulcorantes.....	74
Quadro 1.	Micro-organismos com propriedades probióticas.....	18

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Colônias típicas de <i>Lactobacillus casei</i> em meio MRS.....	36
Figura 2.	Superfície de resposta do crescimento (g/L) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 em suco de laranja de acordo com pH inicial e T (°C) de fermentação.....	46
Figura 3.	Superfície de resposta da viabilidade (Log UFC/mL) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 em suco de laranja de acordo com pH inicial e T (°C) de fermentação.....	47
Figura 4.	Crescimento (g/L) do <i>L. casei</i> no suco de laranja ao longo de 24 h de fermentação.....	51
Figura 5.	Biomassa (g/L) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo das 20 h fermentação do suco de laranja otimizado.....	53
Figura 6.	Viabilidade (Log UFC/mL) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo de 42 dias de estocagem do suco de laranja otimizado armazenado sob refrigeração a 4°C.....	55
Figura 7.	Biomassa (g/L) do <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo de 42 dias de estocagem do suco de laranja otimizado armazenado sob refrigeração a 4°C.....	56
Figura 8.	Concentração (g/L) de açúcares no suco de laranja com <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo das 20 h de fermentação.....	57
Figura 9.	Concentração (g/L) de açúcares no suco de laranja com <i>L. casei</i> NRRL B-442 ao longo de 42 dias de estocagem sob refrigeração.	60
Figura 10.	Concentração (g/L) de ácido láctico e variação do pH no suco de laranja ao longo das 20 h de fermentação.....	62
Figura 11.	Concentração (g/L) de ácido láctico e variação do pH no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento sob refrigeração.....	64
Figura 12.	Concentração de ácido ascórbico (mg/L) no suco de laranja fermentado ao longo do armazenamento sob refrigeração.....	65
Figura 13.	Suco de laranja fermentado a T=30°C e pH=6,0 com <i>L. casei</i> B-442.....	68
Figura 14.	Variações de luminosidade (L*) no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento.....	69

Figura 15.	Variações na cor verde (-a*) no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento.....	69
Figura 16.	Variações na cor amarela (+b*) no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento.....	70
Figura 17.	Distribuição dos provadores (n=57) de acordo com aceitação do suco de laranja fermentado não adoçado.....	71
Figura 18.	Distribuição dos provadores (n=50) de acordo com aceitação do suco de laranja fermentado adoçado com açúcar.....	72
Figura 19.	Distribuição dos provadores (n=50) de acordo com aceitação do suco de laranja fermentado adoçado com estévia.....	73
Figura 20.	Distribuição dos provadores (n=50) de acordo com a preferência entre o suco adoçado com açúcar e com estévia.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - percentual

AA- Ácido Ascórbico

AGCC- Ácido Graxo de Cadeia Curta

AL- Ácido Lático

BAL- Bactérias Ácido Láticas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

IFN- Interferon

IgA- Imunoglobulina A

IL- Interleucina

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

MRS- Man, Rogosa, Sharpe

TNF- Fator de Necrose Tumoral

UFC- Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Alimentos funcionais	16
2.2	Alimentos probióticos	17
2.3	Importância da microflora intestinal	19
2.4	Efeitos benéficos dos probióticos	20
2.5	Probióticos na indústria de alimentos	26
2.6	Ingestão de probióticos: fontes e recomendações	27
2.7	Produtos vegetais como fonte de probióticos	29
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo Geral	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Obtenção e ativação do micro-organismo	34
4.2	Formulação do suco de laranja	34
4.3	Preparo do suco de laranja com probióticos	35
4.4	Determinação do crescimento microbiano	35
4.5	Análise da viabilidade do <i>L. casei</i> no suco fermentado	36
4.6	Análise do pH	36
4.7	Otimização do processo de produção do suco	37
4.8	Análise dos açúcares e ácidos orgânicos	38
4.9	Análise da cor	38
4.10	Análise sensorial do suco de laranja probiótico	39
4.11	Análise dos dados	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Crescimento e viabilidade do <i>L. casei</i> nas três formulações de suco ..	42
5.2	Crescimento e viabilidade do <i>L. casei</i> nos ensaios do Planejamento Experimental	43
5.3	Crescimento e viabilidade do <i>L. casei</i> de acordo com o tempo de fermentação	49
5.4	Crescimento e viabilidade do <i>L. casei</i> no suco de laranja de acordo	

	com o inóculo.	50
5.5	Crescimento e viabilidade do <i>L. casei</i> no suco de laranja otimizado	52
5.6	Teor de açúcares no suco de laranja otimizado.	56
5.7	Teor de ácidos orgânicos no suco de laranja otimizado.	61
5.8	Avaliação da cor do suco de laranja fermentado.	67
5.9	Análise sensorial do suco de laranja fermentado.	70
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos funcionais tem apresentado um elevado crescimento nos últimos anos, o que reflete a preocupação e o interesse dos consumidores em ingerir alimentos que confirmam benefícios à saúde. Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os que possuem culturas probióticas, ou seja, micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Os principais efeitos benéficos associados ao consumo destes micro-organismos são: regulação da flora e função intestinal, redução da intolerância à lactose, melhora do sistema imunológico, inibição de patógenos, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas.

Os produtos probióticos são encontrados majoritariamente em produtos lácteos, como leite fermentado e iogurtes, sendo poucas as opções de alimentos contendo culturas probióticas em produtos vegetais.

Dessa forma, considerando a relevância dos alimentos funcionais na saúde humana, os benefícios ocasionados pela ingestão de micro-organismos probióticos, o elevado consumo mundial de suco de laranja e que as fontes alimentares de probióticos ainda são muito limitadas aos produtos lácteos, é de fundamental importância que novas bebidas probióticas sejam pesquisadas, a fim não só de ampliar o mercado desses produtos, mas de servir como opção aos que não podem ou não apreciam o consumo de produtos lácteos

Primeiramente foi realizada uma introdução sobre os micro-organismos probióticos, com ênfase na sua definição, efeitos benéficos associados ao seu consumo, principais fontes alimentares dos mesmos e ingestão recomendada. Em seguida, comentou-se a importância em se obter novas fontes alimentares que veiculem micro-organismo probióticos, além dos produtos lácteos.

Posteriormente foi apresentada a avaliação do crescimento e viabilidade do *L. casei* no suco de laranja, bem como as alterações nas características do suco no que diz respeito à cor e teor de açúcares e ácidos orgânicos. Finalmente, verificou-se a aceitação do suco de laranja fermentado por meio de análise sensorial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos Funcionais

Alimentos funcionais são definidos como alimentos que em adição aos nutrientes básicos, suprem o organismo com componentes que contribuem para a cura ou redução do risco de desenvolver doenças (GERMAN et al., 1999; PRADO et al., 2008; SHAH, 2007; URALA; LAHTEENMAKI, 2007).

Saher et al. (2004) ao estudarem a impressão que consumidores têm a respeito de alimentos funcionais, observaram que estes produtos são associados a uma imagem positiva com relação aos benefícios à saúde, sendo considerados um novo caminho para se obter uma alimentação saudável. Além disso, representam inovação quando comparados aos alimentos convencionais.

Os alimentos funcionais não constituem um grupo homogêneo, portanto, suas características não podem ser generalizadas, pois existem diferenças claras entre os diferentes produtos alimentícios ditos funcionais. Dentre os principais fatores que afetam a aceitabilidade e intenção de uso destes alimentos, destacam-se fatores demográficos (gênero, idade e nível educacional) e estilo de vida (URALA; LAHTEENMAKI, 2007).

O interesse no desenvolvimento de alimentos e bebidas funcionais tem aumentado com potencial para melhorar a saúde e bem-estar dos consumidores, principalmente os que produzem efeito benéfico ao intestino, que dominam o mercado de alimentos funcionais (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004^a; PRADO et al., 2008; SORENSON; BOGUE, 2005; THAMER; PENNA, 2006). Nesse contexto, a ingestão de fontes de micro-organismos probióticos está crescendo como uma tendência de consumo global (SHEEHAN et al., 2007; VERBEKE, 2005).

2.2 Alimentos Probióticos

Uma suplementação sistemática da dieta com probióticos, prebióticos e simbióticos pode manter um equilíbrio da microbiota intestinal (COELHO; OLIVEIRA, 2009). Em virtude desse fato, o conceito de alimentos funcionais passou a concentrar-se de maneira intensiva em produtos que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos compõem esses alimentos funcionais (SAAD, 2006).

O termo “probiótico” é de origem grega, e significa “para a vida” (COELHO; OLIVEIRA, 2009; FERNANDES et al., 2008). Este termo foi usado pela primeira vez pelos veterinários Lilly e Stillwel em 1965 para denominar substâncias secretadas por micro-organismos que estimulavam o crescimento de outros micro-organismos (CARAMIA et al., 2008; COPPOLA; TURNES, 2004; FOOKS et al., 1999). Fuller et al. (1989) redefiniu o termo probiótico como organismos vivos que quando ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da flora bacteriana intestinal do hospedeiro. Essa definição mostra que é necessário considerar a viabilidade da célula para que haja a função probiótica (FOOKS et al., 1999; SAAD, 2006; TURGUT; CAKMAKCI, 2009; WAITZBERG, 2000).

Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos, entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é a de que os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos são alimentos ou suplementos microbianos que podem ser usados para mudar ou regular o equilíbrio intestinal, melhorando a saúde do hospedeiro. Eles contribuem para esse equilíbrio uma vez que realizam uma repopulação direta do meio intestinal (FARIA et al., 2006; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005; SAULNIER et al., 2009). Coelho; Oliveira (2009) comentam que os probióticos são considerados bioterapêuticos, bioprotetores, ou bioprofiláticos devido à melhoria das propriedades da microflora nativa.

As formas mais comuns de probióticos são os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, uma vez que eles têm sido isolados de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (DOUGLAS; SANDERS, 2008; FERNANDES et al., 2008; FOOKS et al., 1999; GUTIÉRREZ-LÓPEZ; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003; MATTILA-SANDHOLM et al, 2002; SAAD, 2006; SAXELIN et al., 2008; SHAH, 2007; SHEEHAN et al., 2007). No entanto, estes não são os únicos gêneros com características probióticas, Prado et al. (2008) e Shah (2007) citam que os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Saccharomyces*, *Propionibacterium* possuem espécies consideradas como micro-organismos probióticos (Quadro 1).

Quadro 1: Micro-organismo com propriedades probióticas.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Micro-organismos não ácido lácticos
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			

Adaptado de Holzapfel et al. (2001).

O gênero *Lactobacillus* foi isolado pela primeira vez por Moro em 1900 a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno. Assumem a forma bacilar ou cocobacilar, são *Gram*-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos e aerotolerantes ou anaeróbios (FERNANDES et al., 2008). São ainda fermentadores, produtores de ácido láctico como resultado final da fermentação de carboidratos. (ROSA; FRANCO, 2002). Existem 56 espécies reconhecidas como pertencentes a esse gênero, as mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* (FERNANDES et al., 2008).

Na teoria, os probióticos podem ser responsáveis por alguns efeitos colaterais, como: estimulação excessiva do sistema imune, transferência genética e infecções em indivíduos suscetíveis. Na prática, no entanto, são extremamente raros como causadores de infecções e várias cepas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm o *status* de GRAS (Generally Recognised As Safe) e muitas outras têm um histórico de uso seguro há anos em alimentos (DE VUYST et al., 2008; DEL PIANO et al., 2006).

2.3 Importância da microflora intestinal

De acordo com Caramia et al. (2008), a mucosa intestinal do adulto contém uma superfície de aproximadamente 250m², com bilhões de microorganismos de aproximadamente 500 espécies, sendo a maioria deles anaeróbicos. O intestino delgado contém apenas poucas espécies aderidas ao epitélio e algumas outras bactérias em trânsito. O intestino grosso, no entanto, contém um dinâmico e complexo ecossistema microbiano com elevada densidade de bactérias, em concentrações de 10¹⁰–10¹⁴ células por grama de conteúdo intestinal (CANDELA et al., 2008; DEL PIANO et al., 2006; UYENO et al., 2008).

A microflora intestinal apresenta várias funções metabólicas, tróficas e de proteção. As funções metabólicas são primariamente caracterizadas pela fermentação de fibras dietéticas não digeríveis (prebióticos), resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produção de vitamina K e B12, além da absorção de íons. As funções tróficas são baseadas no controle da diferenciação e

proliferação das células epiteliais, além do desenvolvimento e homeostase do sistema imunológico. No que diz respeito à proteção, ela está relacionada ao efeito contra patógenos, uma vez que forma uma barreira contra micro-organismos invasores e potencializa a resposta imune do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2009; DEL PIANO et al., 2006).

Os AGCC exercem papel fundamental na fisiologia normal do cólon, no qual constituem a principal fonte de energia para os enterócitos e colonócitos, estimulam a proliferação celular do epitélio, o fluxo sanguíneo visceral e intensificam a absorção de sódio e água (ALMEIDA et al., 2009).

Assim, a microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos adversos (SAAD, 2006). Assim, a atividade metabólica intestinal exerce um impacto significativo na saúde e bem-estar geral do hospedeiro (ZIEMER; GIBSON, 1998).

2.4 Efeitos benéficos dos probióticos

O efeito mais importante relacionado aos micro-organismos probióticos é seu papel inibitório aos micro-organismos patógenos, no entanto, inúmeros outros efeitos benéficos são atribuídos aos probióticos, dentre eles: redução do colesterol, promoção da digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse carboidrato, função intestinal, função antitumoral, melhora do sistema imune, supressão de infecções por *Helicobacter pylori*, alívio da constipação, equilíbrio da flora intestinal e aumento do valor nutritivo, por aumentar a absorção de minerais e produzir vitaminas do complexo B (COPPOLA; TURNES, 2004; DE VUYST et al., 2008; DOUGLAS; SANDERS, 2008; DROUAULT-HOLLOWACZA et al., 2008; LUCKOW; DELAHUNTY, 2004^a; SHAH, 2007; WAITZBERG, 2000; ZIEMER; GIBSON, 1998).

Douglas; Sanders (2008) e Turgut; Cakmakci (2009) enfatizam que esses efeitos foram observados em uma única cepa ou em um número limitado delas, mostrando que outras cepas da mesma espécie podem não exercer o mesmo papel na saúde humana. Shah (2007) acrescenta que os benefícios observados são específicos para cada cepa, e não para cada espécie ou gênero e que uma cepa não conseguirá, sozinha, apresentar todos os benefícios citados ao hospedeiro.

2.4.1 Inibição de patógenos

A barreira celular intestinal é a primeira linha de defesa contra o ataque de patógenos, que pode ser melhorada com a produção de mucina e redução da permeabilidade intestinal. Estas previnem a penetração de organismos patógenos e substâncias tóxicas na barreira intestinal. Determinadas proteínas são importantes para a adesão de probióticos à superfície das células e podem obstruir a adesão de patógenos a essa superfície (GILLILAND et al., 2002; SAULNIER et al., 2009).

De acordo com Candela et al. (2008), em condições patológicas, como em diarreias ou terapia com antibióticos, a microbiota intestinal pode ser depletada, ocasionando efeitos negativos no bem-estar do hospedeiro e aumentando a susceptibilidade de infecções por bactérias patogênicas. Shah (2007) comenta que os probióticos têm mostrado eficácia como medida profilática em terapias com antibióticos. Esses efeitos positivos decorrentes da ingestão de probióticos ocorrem em virtude do restabelecimento da microbiota balanceada, contribuindo para o desenvolvimento normal do intestino e para uma maior eficácia na defesa contra a invasão bacteriana (GIRALT et al., 2008).

A modulação da microbiota intestinal pelos micro-organismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado “exclusão competitiva” (BETORET et al., 2003; CAREY et al., 2008; COELHO; OLIVEIRA, 2009; WAITZBERG, 2000). Estes organismos inibem o crescimento excessivo de bactérias patogênicas mediante competição por locais de adesão e nutrientes. Além disso, elas produzem substâncias bactericidas como: bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, diacetil e

ácidos orgânicos, que reduzem o pH intestinal e retardam o crescimento de bactérias patogênicas sensíveis a ácidos (COPPOLA; TURNES, 2004; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005; SAAD, 2006; SHAH, 2007; WAITZBERG, 2000).

Fooks et al. (1999) comentam que possivelmente os probióticos atenuam a virulência dos patógenos e bloqueiam os sítios receptores de toxinas. As bifidobactérias diminuem a atividade de bactérias putrefativas que podem levar à formação de substâncias tóxicas: amônia, aminas, substâncias cancerígenas como as nitrosaminas, estrogênios, ácidos biliares secundários, fenóis e cresóis (PACHECO, 2006).

As bacteriocinas são pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas, variam consideravelmente quanto ao micro-organismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas. A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem caracterizada atualmente. Descoberta nos anos 20, ela inibe a multiplicação de bactérias *Gram*-positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes* e é a única bacteriocina produzida comercialmente e legalizada para utilização em alimentos (ROSA; FRANCO, 2002).

Pereira; Gómez (2007) ao estudarem a atividade antimicrobiana do *Lactobacillus acidophilus* contra micro-organismos patogênicos observaram que esta bactéria produziu uma substância extracelular e difusível, que apresentou ação inibidora sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Carey et al. (2008) ao estudarem o efeito de culturas probióticas sobre a expressão genética da toxina Shiga produzida pela bactéria *Escherichia coli* O157:H7 observaram que os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* foram capazes de reduzir a produção desta toxina.

Os probióticos têm a capacidade de aderir à superfície do enterócito previamente colonizada por bactérias enteropatogênicas. Este comportamento é fundamental para que a bactéria probiótica exerça atividade antagônica contra

patógenos, bem como a produção de substâncias inibitórias, redução do pH luminal e competição por nutrientes (CANDELA et al., 2008). Indrio et al. (2008) ao avaliarem o efeito do uso de probióticos em recém nascidos pré-termo, observaram melhora na motilidade e função gastrointestinal desse grupo de indivíduos.

A microbiota intestinal desbalanceada causa alterações como a diarreia associada a infecções ou ao tratamento por antibióticos, alergia alimentar, eczema atópico, doenças inflamatórias intestinais e artrite. Assim sendo, a correção das propriedades de uma microbiota autóctone em desequilíbrio constitui-se a base da terapia por probióticos (SAAD, 2006).

2.4.2 Redução da intolerância à lactose

A má absorção da lactose é uma condição comum, em que a lactose, o principal carboidrato do leite, não é completamente hidrolisada em glicose e galactose, levando a sintomas gastrointestinais após o consumo de produtos lácteos. Uma vez que a hidrólise é realizada pela enzima β -D-galactosidase, a má absorção resulta da deficiência desta enzima (SHAH, 2007).

É geralmente observado que os produtos de leite fermentado, tais como iogurte, são melhores tolerados do que o leite (COELHO; OLIVEIRA, 2009). Fooks et al. (1999) e Saad (2006) atribuem a melhora da intolerância à lactose pelo uso de probióticos, em virtude dos mesmos produzirem a enzima β -D-galactosidase, auxiliando a quebra da lactose no intestino.

2.4.3 Melhora do Sistema Imunológico

Diferentes cepas de probióticos podem estimular ou suprimir a resposta imune. Os efeitos supressivos são manifestados pela redução na expressão de citocinas, na proliferação celular e aumento na apoptose (SAULNIER et al., 2009).

Com relação ao efeito estimulante no sistema imunológico, os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por ativação dos macrófagos, aumento nos níveis de citocinas, aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - “*natural killer*”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (D’ARIENZO et al., 2008; SAAD, 2006).

De acordo com Coppola; Turnes (2004) a melhora no sistema imune está relacionado à capacidade dos micro-organismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino. Também podem favorecer a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune.

Leblanc et al. (2008) ao estudarem o efeito da ingestão de leite fermentado contendo bactérias probióticas sobre a imunidade intestinal e atividade de macrófagos observaram que os níveis de IgA aumentaram no intestino delgado e grosso. Além da IgA, IL-2, IL-10, IFN e TNF também tiveram seus valores aumentados, melhorando a imunidade intestinal.

Vários estudos demonstram que o gênero *Lactobacillus* modula o sistema imunológico contra alergias, apontando que a composição da microflora intestinal seria um elemento comum nas doenças alérgicas. As espécies de probióticos poderiam ter um papel na prevenção e tratamento dessas doenças (CARAMIA et al., 2008) e melhora na hipersensibilidade ao glúten observada na doença celíaca (D’ARIENZO et al., 2008).

2.4.4 Redução de lipídios séricos

O nível de colesterol sérico, particularmente o LDL- colesterol é o maior fator de risco para doenças coronarianas (SHAH, 2007). Apesar de poucos estudos clínicos terem sido realizados, todos mostraram que a ingestão de probióticos

exerceu influência sobre os lipídios de uma maneira similar, reduzindo os níveis de colesterol total, da fração LDL e de triglicerídeos (SAAD, 2006).

Os AGCC resultantes da fermentação dos carboidratos possivelmente causam diminuição das concentrações sistêmicas dos lipídeos sanguíneos, por meio da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado (SAAD, 2006). Fooks et al. (1999) acrescentam que os probióticos podem assimilar diretamente o colesterol ou interferir na sua absorção intestinal, o que levaria à redução das suas taxas.

Fernandes et al. (2008) e Gilliland et al. (2002) comentam que algumas bactérias lácticas possuem atividade de sais biliares hidrolase, ou seja, desconjugam os sais biliares, tornando-os menos solúveis em pH mais baixo. Dessa forma, os ácidos biliares tornam-se indisponíveis para reabsorção no fígado, sendo eliminados nas fezes, e assim mais colesterol é requerido para síntese de novos sais biliares no fígado, diminuindo o nível de colesterol sanguíneo.

2.4.5 Efeito anticancerígeno

Acredita-se que o papel anticarcinogênico dos probióticos está relacionado à sua capacidade de inibir enzimas pró-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imune do hospedeiro (COPPOLA; TURNES, 2004). Shah (2007) comenta que algumas cepas são capazes de inibir enzimas como a nitroreductase e a β -glucuronidase, que são responsáveis pela formação de pró-carcinogênicos.

Fooks et al. (1999) propõem os seguintes mecanismos para a ação anti-tumoral associada ao uso de probióticos: supressão de pró-carcinogênicos; supressão de bactérias que podem converter essas substâncias em substâncias carcinogênicas; alteração do trânsito intestinal, removendo toxinas e estimulação do sistema imune. A produção de AGCC reduz a atividade enzimática e conseqüentemente a formação de produtos carcinogênicos (SHAH, 2007).

2.5 Probióticos na indústria de alimentos

De acordo com Calderón et al.(2007), os probióticos representam um grande potencial para a indústria de alimentos devido à sua capacidade de eliminar e competir contra micro-organismos patogênicos intestinais. German et al. (1999) ressaltam que uma mesma bactéria probiótica pode ser usada em diferentes condições fisiopatológicas, que não têm o mesmo mecanismo de ação.

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Esse desempenho pode ser avaliado pela multiplicação no alimento, promoção de propriedades sensoriais adequadas no produto e estabilidade e viabilidade durante armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (CRUZ et al., 2009; MATTILA-SANDHOLM et al, 2002; OLIVEIRA et al., 2002). A manutenção da viabilidade destes micro-organismos durante toda a vida de prateleira do produto a que foram adicionados representa um grande desafio para a indústria de alimentos (DOUGLAS; SANDERS, 2008).

Dentre os fatores que influenciam a viabilidade das bactérias probióticas no produto elaborado, podem ser destacados o gênero, espécie e cepa do micro-organismo; a formulação e composição do alimento (acidez, conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral e atividade de água) ao qual foram adicionadas; as condições físicas de estocagem (tempo, temperatura) e possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) (DEL PIANO et al., 2006; FARIA et al., 2006).

Estudos com cepas de *L. casei* têm mostrado que esse micro-organismo tem utilização favorável em alimentos que visam à promoção da saúde devido à sua performance tecnológica, capacidade de adesão *in vitro* e tolerância ao trânsito intestinal (ARYANA; MCGREW, 2007; BERTAZZONI et al., 2004).

De acordo com Faria et al. (2006), na produção de um alimento probiótico é fundamental que a bactéria probiótica possa ser cultivada em escala industrial, sendo que o produto final deve ter vida média satisfatória, variando de 15 a 30 dias e propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e textura) aceitáveis, com os micro-organismos presentes no produto viáveis e em número elevado ($>10^6$ UFC/mL) durante a vida de prateleira.

Os micro-organismos probióticos devem apresentar algumas características específicas: ser habitantes da flora intestinal, reproduzir-se rapidamente, produzir substâncias antimicrobianas, resistir ao tempo entre a fabricação, comercialização e ingestão do produto e resistir às secreções gástrica, intestinal, biliar e pancreática a fim de atingirem o intestino ainda vivos (DE VUYST et al., 2008; DEL PIANO et al., 2006; FERNANDES et al., 2008; GERMAN et al., 1999; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; PRADO et al., 2008; WAITZBERG, 2000; ZIEMER; GIBSON, 1998). Além das propriedades mencionadas, os probióticos devem ser inócuos, não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, assim como resistir a fagos e ao oxigênio (COPPOLA; TURNES, 2004).

2.6 Ingestão de probióticos: fontes e recomendações

A dose de micro-organismos probióticos requerida varia em função da cepa utilizada e do efeito desejado, no entanto, vários autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 a 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (CRUZ et al., 2009; DOUGLAS; SANDERS, 2008; FERNANDES et al., 2008; PRADO et al., 2008; SAAD, 2006). Shah (2007) e Sheehan et al. (2007) também afirmam que em geral a indústria de alimentos adota a recomendação de 10^6 UFC/g para os produtos probióticos no momento do consumo. De acordo com a legislação brasileira, fermentados lácteos probióticos devem apresentar um mínimo de 10^6 UFC/ml (BRASIL, 2000). De acordo com Faria et al. (2006) e Saulnier et al. (2009), estes produtos devem ser consumidos regularmente para manter o efeito dos micro-organismos na composição da microbiota intestinal.

É recomendado que o rótulo dos alimentos probióticos contenha as seguintes informações: designação do gênero, espécie e cepa; número mínimo de probióticos viáveis ao final da vida de prateleira; a dose efetiva do probiótico para atingir as alegações à saúde; benefícios à saúde e condições apropriadas de estocagem (DOUGLAS; SANDERS, 2008; FAO/WHO, 2002).

Produtos fermentados lácteos produzidos por Bactérias Ácido Lácticas (BAL) representam uma importante parte da nossa dieta (VLIEG; HUGENHOLTZ, 2007). Essas bactérias são assim denominadas por fermentarem açúcares, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo. Elas agem acidificando os produtos alimentares, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e aumentando o período de conservação dos produtos fermentados em relação à matéria prima não fermentada (FARIA et al., 2006; HAUKIOJA et al., 2008).

Prado et al. (2008) comentam que os produtos lácteos têm sido usados tradicionalmente como veículos de bactérias probióticas em humanos, sendo as BAL o mais importante grupo de micro-organismos utilizados na elaboração de leites fermentados. Como os leites fermentados promovem uma elevada ingestão de bactérias benéficas ao balanço intestinal, eles constituem um importante segmento no mercado de alimentos funcionais.

Leites fermentados e iogurtes são os principais produtos comercializados no mundo contendo culturas probióticas, que são adicionadas além das culturas iniciadoras (CRUZ et al., 2009; DOUGLAS; SANDERS, 2008; FARIA et al., 2006; GILLILAND et al., 2002; SHAH, 2007). Bactérias que não são encontradas originalmente no alimento são adicionadas ao mesmo com o intuito de aumentar os benefícios após sua ingestão (GUTIÉRREZ-LÓPEZ; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003).

Outros produtos comerciais contendo essas culturas incluem sobremesas à base de leite, leite em pó destinado a recém nascidos, diversos tipos de queijo, cereais e carnes fermentadas, sorvetes e sucos de frutas, além de produtos na fórmula de cápsulas ou em pó (CRUZ et al., 2009; DE VUYST et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2002; SAXELIN et al., 2008).

O aumento de consumidores vegetarianos gera uma demanda por produtos probióticos a base de vegetais. Além disso, dois fatores levam ao recuo no consumo de leite fermentado, são eles: intolerância à lactose e o colesterol presente nesses produtos (BETORET et al., 2003; KUN et al., 2008; PRADO et al., 2008; YOON et al., 2005; YOON et al., 2006).

2.7 Produtos vegetais como fonte de probióticos

De acordo com Sheehan et al. (2007) e Yoon et al. (2004), sucos de frutas podem representar um meio ideal de veículo de culturas probióticas aos consumidores, uma vez que são consumidos regularmente, sendo este fator essencial para que os probióticos exerçam suas funções. Luckow et al. (2006) comentam que os sucos de frutas têm sido sugeridos como um apropriado meio para adição de culturas probióticas, uma vez que são tidos como produtos alimentares saudáveis e são consumidos por uma larga parcela da população.

Luckow; Delahunty (2004^b) e Yoon et al. (2006) acrescentam que os sucos de frutas não têm o inconveniente de apresentar alérgenos, como ocorre em alguns produtos lácteos, que acabam limitando o consumo do produto por certos segmentos da população. Sorenson; Bogue (2005) afirmam que as bebidas probióticas a base de suco de frutas podem tornar-se uma importante categoria de alimentos probióticos nos próximos anos.

Prado et al. (2008) citam diversos estudos em que a tentativa de bebida probiótica obteve êxito, como: suco de beterraba, suco de tomate e suco de cenoura. Estes autores comentam que existem muitas razões para acreditar que as bebidas não-lácteas serão a próxima grande categoria de alimentos probióticos, destacando-se os sucos de frutas e de vegetais, por mais que a adição de probióticos em sucos seja mais complexa do que produtos lácteos, uma vez que as bactérias precisam de proteção contra as condições ácidas dos sucos de frutas.

Sheehan et al. (2007) ao estudarem a viabilidade de micro-organismos probióticos em suco de abacaxi, observaram que as bactérias *L. casei*, *L.*

rhamnosus e *L. paracasei* mostraram-se resistentes ao baixo pH por mais de 4 semanas de estocagem, tendo um potencial promissor para suplementação em sucos de frutas. Yoon et al. (2006) afirmam que as bactérias *L. plantarum* e *L. delbrueckii* podem ser usadas como culturas probióticas em suco de repolho fermentado, uma vez que se mostraram resistentes ao baixo pH e elevada acidez nessa bebida, mantendo-se viáveis por várias semanas a temperatura de refrigeração. Yoon et al. (2005) também sugerem que sucos vegetais servem como bom meio para o crescimento de probióticos, observando que *L. plantarum*, *L. casei* e *L. delbrueckii* cresceram em suco de beterraba e permaneceram estáveis durante estocagem a 4°C.

Yoon et al. (2004) ao estudarem a viabilidade de diferentes espécies de *Lactobacillus* em suco de tomate, observaram que essa bebida proporcionou elevado crescimento da bactéria, a qual foi capaz de manter-se viável numa concentração acima de 10⁶ UFC/mL após estocagem sob refrigeração. Fernandes et al. (2008) comentam que o controle da viabilidade das estirpes no momento de consumo do alimento que serve de veículo é de elevada importância para assegurarem o efeito benéfico dos produtos probióticos.

A fermentação produz impacto sobre a qualidade sensorial dos produtos alimentares devido à transformação química de alguns componentes (VLIEG; HUGENHOLTZ, 2007). Luckow; Delahunty (2004^b) comentam que é de fundamental importância compreender o impacto sensorial (mudanças na aparência, textura, sabor e aroma) que culturas probióticas podem ocasionar em produtos não lácteos, com o objetivo de direcionar o desenvolvimento e formulação desses produtos.

De acordo com Luckow et al. (2004), os sucos de laranja contendo probióticos são associados a um sabor não característico do suco. Como este sabor não característico pode comprometer o consumo dos alimentos probióticos com relação às quantidades e frequência adequadas para se obter efeitos benéficos, é de interesse da indústria de alimento melhorar a aceitabilidade desses alimentos. De acordo com estes autores, isto tem sido conseguido com a adição de sucos de frutas tropicais (como abacaxi e manga) para mascarar o sabor estranho do suco

probiótico. Tuorila; Cardelo (2002) comentam que a presença de um sabor não característico em alimentos funcionais pode diminuir drasticamente o seu consumo, por isso o grande desafio para os produtores destes alimentos é desenvolvê-los com um sabor que seja aceitável pelos consumidores.

Sorenson; Bogue (2005) comentam que a alteração no sabor associada às bactérias probióticas é mais pronunciada em alimentos e bebidas não-lácteas quando comparados aos produtos lácteos.

É sabido que sucos adicionados de probióticos têm sabores diferentes dos sucos convencionais, no entanto, apesar do impacto sensorial que a adição desses micro-organismos pode causar em suco de frutas, existe um interesse genuíno na produção de bebidas funcionais fortificadas com essas bactérias (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004^a).

A presença de probióticos em sucos de frutas não indica, necessariamente, redução de sua aceitação. Luckow; Delahunty (2004^b) ao compararem a aceitação de suco de cassis com e sem probiótico, observaram que consumidores do sexo feminino preferiram todas as características sensoriais dos sucos probióticos. De acordo com Fernandes et al. (2008), as culturas probióticas podem contribuir para melhorar o sabor do produto final.

Segundo Luckow et al. (2006) fatores não sensoriais podem influenciar no consumo de alimentos probióticos, dentre eles destaca-se a informação com relação aos benefícios que os mesmos trazem à saúde. Luckow; Delahunty (2004^a) e Verbeke (2006) comentam que o sabor é o principal fator que motiva ao consumo de alimentos, seguido pelas considerações com relação à saúde. Tais resultados apontam uma nova preocupação por parte dos consumidores e que devem ser levadas em consideração pelos produtores ao elaborarem novos alimentos funcionais. Tuorila; Cardelo (2002) também observaram que a informação acerca dos benefícios à saúde que o alimento pode levar ao consumidor melhora a aceitação do produto.

Mattila-Sandholm et al. (2002) afirmam que a incorporação de probióticos aos alimentos para elaboração de novos produtos deve ser feita considerando a manutenção da viabilidade da bactéria no alimento, sem criar textura e/ou *flavor* indesejável no mesmo. Dessa forma, neste trabalho serão estudadas a viabilidade do micro-organismo e as características sensoriais do alimento probiótico elaborado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um alimento probiótico a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei*.

3.2 Objetivos Específicos

Otimizar a composição do meio de cultura para melhor crescimento do micro-organismo;

Estudar o crescimento e a viabilidade do micro-organismo utilizado em diferentes formulações do suco de laranja;

Verificar as alterações nos teores de açúcares e ácidos orgânicos no suco de laranja fermentado;

Analisar a aceitação do suco de laranja fermentado com micro-organismos probióticos;

Contribuir para o consumo de alimentos funcionais, uma vez que proporcionará uma potencial fonte de probióticos às pessoas que não consomem produtos lácteos.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e ativação do micro-organismo

Foi utilizada uma cultura estoque do micro-organismo *Lactobacillus casei* NRRL B-442 (ARS Culture Collection, Peoria, Illinois, USA). O *L. casei* foi ativado em caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) a 37°C por um tempo suficiente (~16h) para atingir absorbância de 0,600, correspondente a 10⁹UFC/mL utilizando-se a escala de MacFarland (MARIANO, 2000).

4.2 Formulação do suco de laranja

Foi utilizado suco de laranja concentrado sem adição de conservantes e de açúcar, diluído de acordo com a recomendação do fabricante, 1:7. O suco foi inicialmente caracterizado quanto ao seu pH inicial, ácidos orgânicos, açúcares e cor. Foi avaliado o crescimento do *L. casei* nas diferentes formulações do suco apresentadas abaixo. De acordo com a ANVISA (2007), o NaOH pode ser utilizado como aditivo alimentar segundo as Boas Práticas de Fabricação, com a função de regulador de acidez.

Suco	Formulação
1	Apenas suco (controle)
2	Suco pH ajustado 6.5 (com NaOH)
3	Suco + Fosfato a pH 6.5 (com NaOH)

4.3 Preparo do suco de laranja com probióticos

O meio MRS (1mL) contendo o micro-organismo ativado foi inoculado nos sucos 1, 2 e 3 nas concentrações de 10^5 a 10^7 UFC/mL. Esta concentração foi considerada com base na legislação em vigor que determina que fermentados probióticos devem apresentar um mínimo de 10^6 UFC/ml no final da sua vida de prateleira (BRASIL, 2000). O suco foi fermentado por 24 h a 37°C , sendo o crescimento do micro-organismo e o pH do suco determinados a cada 2 h e a viabilidade após 24 h de fermentação.

4.4 Determinação do crescimento microbiano durante a fermentação

A biomassa e o crescimento do *L. casei* foi quantificado por meio da determinação da densidade ótica a 590 nm (RODRIGUES et al., 2003). Para tal, foi medida a absorbância do suco recém inoculado com *L. casei* (absorbância inicial) e a absorbância do suco após 24 h de fermentação (absorbância final) em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP200UV. O procedimento consistiu em diluir (1:10) uma alíquota do suco contendo as células em água destilada e realização da leitura da absorbância contra um branco com água. A diferença entre a absorbância final e a inicial correspondeu ao crescimento do micro-organismo durante a fermentação. O crescimento foi expresso em g/L, considerando a curva de calibração do micro-organismo (base seca) (Equação 1).

$$m(g/L) = \frac{ABS(590nm - 0,00818)}{3,395} \quad (1)$$

Onde: m(g/L) biomassa do *L. casei* em base seca (g/L)

4.5 Análise da viabilidade do *L. casei* no suco fermentado

Após 24 h de fermentação, foi realizada diluição seriada dos sucos de laranja (nas 3 diferentes formulações) em água peptonada esterilizada até se obter a diluição de 10^{-6} . Alíquotas de 0,1mL do suco diluído foram inoculadas em placas contendo MRS Agar, em plaqueamento de superfície com auxílio de uma alça de Drigalski, sendo as placas semeadas em duplicata. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 72h. Após esse período, foi realizada a contagem das colônias típicas de *L. casei* que, de acordo Vinderola; Reinheimer (2000), são colônias redondas, cor branco cremoso, com diâmetro de 0,9 a 1,3mm.

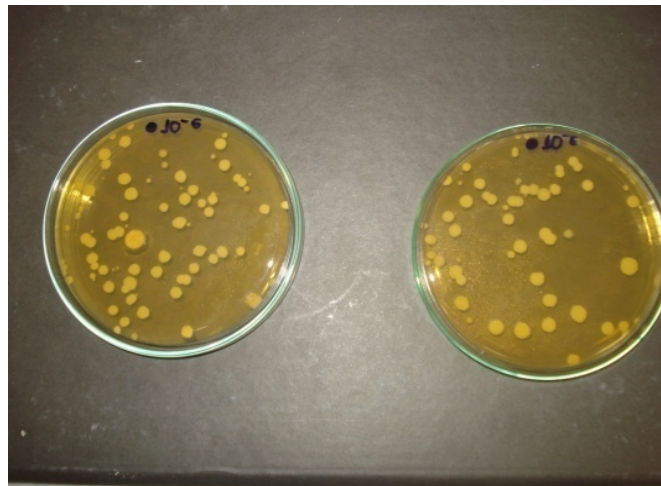


Figura 1: Colônias típicas de *Lactobacillus casei* em meio MRS.

A medida da biomassa e da viabilidade do *L. casei* no suco fermentado otimizado seguiu a mesma metodologia dos itens 4.4 e 4.5, mas foi avaliada ao término de 20 h de fermentação e semanalmente durante as seis semanas de estocagem. Durante a estocagem o suco permaneceu acondicionado em garrafa de vidro transparente a uma temperatura constante de 4° C.

4.6 Análise do pH

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca Marconi®, modelo PA200, calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme a AOAC (1992).

4.7 Otimização do processo de produção do suco

Após seleção da formulação adequada do suco (considerando crescimento em g/L e viabilidade do *L. casei*) foi realizado um planejamento experimental para otimização das condições de fermentação, onde pH e temperatura foram variados (Tabela 1).

O suco foi elaborado conforme descrito no item 4.3, com inóculo inicial de 10^7 UFC/mL e distribuído em 11 erlenmeyers (100mL para cada erlenmeyer). Após caracterização do pH inicial, este foi ajustado pela adição de NaOH 3M até atingir os diferentes valores de pH delineados no planejamento.

Tabela 1: Ensaios do Planejamento Experimental

Ensaio	pH	T (°C)
1	4,70 (-1)	15,00 (-1)
2	4,70 (-1)	37,00 (+1)
3	6,70 (+1)	15,00 (-1)
4	6,70 (+1)	37,00 (+1)
5	4,29 (- α)	26,00 (0)
6	7,11 (+ α)	26,00 (0)
7	5,70 (0)	10,44 (- α)
8	5,70 (0)	41,56 (+ α)
9	5,70 (0)	26,00 (0)
10	5,70 (0)	26,00 (0)
11	5,70 (0)	26,00 (0)

Os resultados avaliados foram: pH, contagem de células viáveis e crescimento (g/L). Amostras foram retiradas a cada 2 h para as determinações. As fermentações foram realizadas estaticamente em câmaras de incubação por 24h.

Após obtenção do pH e temperatura de fermentação ótimos, foram estudados, com base nos melhores resultados de viabilidade e crescimento do micro-organismo, o tempo ideal de fermentação e a quantidade de inóculo.

Assim, todos os parâmetros para elaboração do suco otimizado foram obtidos: melhor componente para correção do pH, temperatura de fermentação, pH, quantidade de inóculo e tempo de fermentação.

4.8 Análise dos açúcares e ácidos orgânicos

O teor de açúcares e de ácidos orgânicos do suco *in natura* e do fermentado foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo quantificados a cada duas horas durante as 20 h de fermentação e semanalmente durante a estocagem a 4°C por seis semanas.

Para análise dos açúcares foi utilizada a coluna BioRad HPX 87C, com as seguintes condições: fase móvel consistiu de água purificada em sistema MiliQ, temperatura da coluna 85°C, fluxo 0,6mL/min. e detector de índice de refração. Para análise dos ácidos orgânicos foi utilizada a coluna BioRad HPX 87H, com as seguintes condições: fase móvel consistiu de ácido sulfúrico a 0,01N, temperatura da coluna 50°C, fluxo 0,6mL/min. e detector de UV 210nm. Estas condições de análise foram baseadas nas recomendações do fabricante das colunas.

4.9 Análise da cor

A cor foi determinada a 25°C usando um colorímetro digital (Minolta CR4000, fonte de luz D65 em espaço de cor L*a*b* do sistema CIE L*a*b). A calibração foi realizada com placa branca padrão, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em L* (luminosidade, -a* (verde;) e +b* (amarelo). A diferença total de cor foi calculada pela expressão $\Delta E = \{ (\Delta L^2) + (\Delta a^2) +$

$(\Delta b^2)^{1/2}$ que expressa a diferença entre o suco no primeiro dia após o preparo e nos demais dias de estocagem (CORTES et al., 2006; RAIMUNDO et al., 2007).

4.10 Análise sensorial do suco de laranja probiótico

O suco de laranja submetido à análise sensorial foi elaborado com água mineral nas condições ótimas de fermentação e acondicionado em garrafa de vidro transparente esterilizada. O produto foi fermentado por 20 h a 30° C e após a fermentação, a garrafa de suco foi imersa em banho de gelo e armazenada sob refrigeração até o momento da análise sensorial. Nos sucos adoçados, a adição do edulcorante foi realizada após a fermentação.

Para participação na análise, os provadores assinaram um termo de consentimento, informando a participação voluntária na pesquisa (Anexo 1). Inicialmente foi realizada uma análise de impressão global do suco não adoçado por meio de ficha de aceitação (Anexo 2). Posteriormente, foi realizada análise de aceitação e preferência dos sucos adoçados após a fermentação (Anexo 3), um deles adoçado com sacarose e o outro com estévia (Stevita[®]). Nos sucos adoçados foi utilizada a concentração de 8,5% para a sacarose e sua concentração equivalente de estévia (conforme recomendação do fabricante 2,5 açúcar: 1 produto Stevita[®], que contém 1% de estévia). A estévia é um edulcorante natural extraído das folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, com poder adoçante cerca de 150 a 300 vezes maior que o da sacarose e estabilidade ao calor e a uma ampla faixa de pH (FERNANDES et al., 2009).

Em todas as análises o suco foi servido à temperatura entre 16 e 18°C, em taças codificadas aleatoriamente com 3 algarismos, numa quantidade de 40mL por taça. A aceitação do suco foi avaliada através da escala hedônica de 9 pontos ancoradas no extremos desgostei muitíssimo e gostei muitíssimo. As porcentagens dos valores hedônicos de 1 a 4 foram somadas e denominadas de “% de rejeição”, enquanto as porcentagens dos valores hedônicos de 6 a 9 foram denominadas de

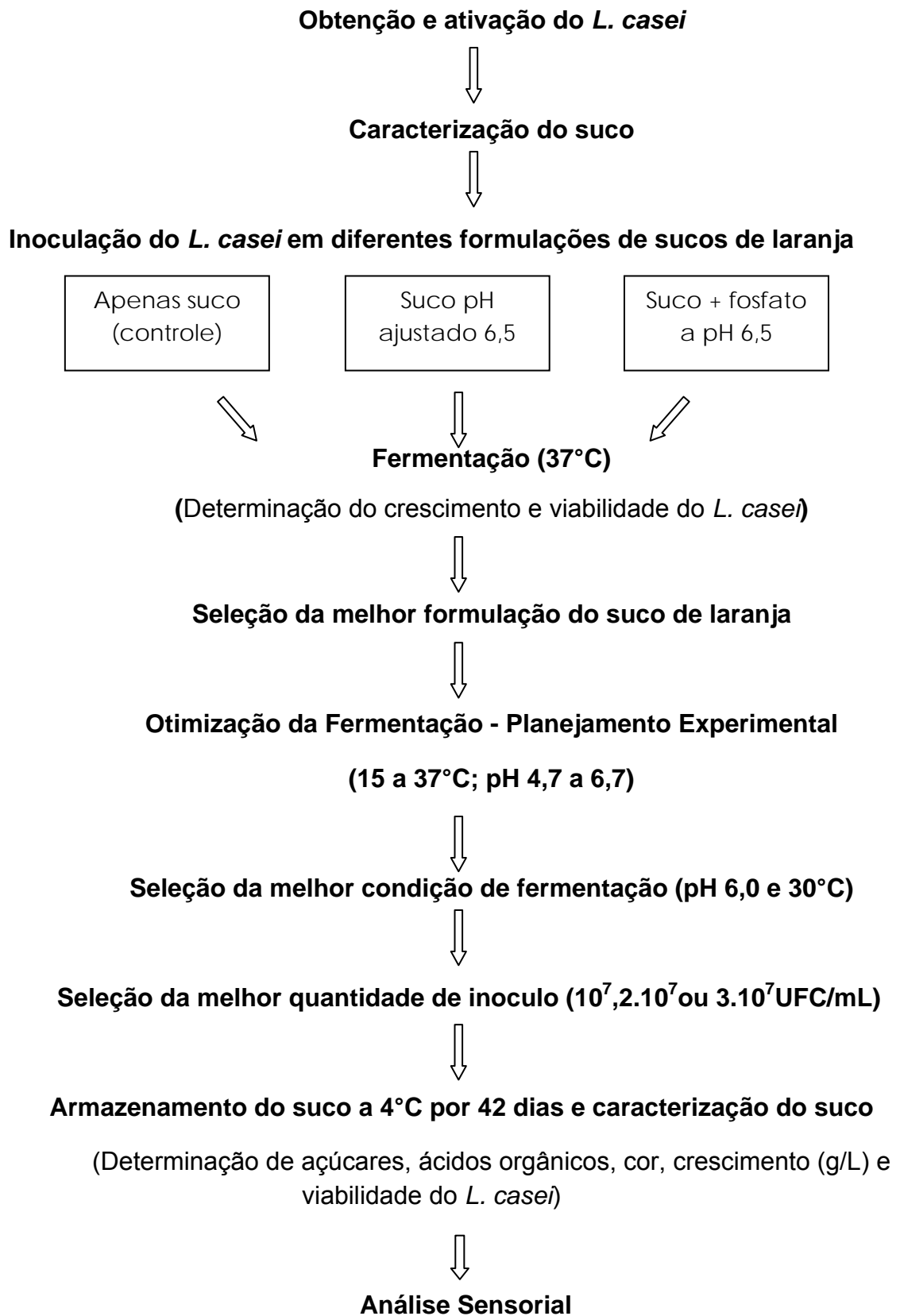
“% de aceitação”; o valor 5 foi considerado como região de indiferença (“nem gostei, nem desgostei”). Um painel de 50 provadores não treinados foi utilizado.

Por meio da diferença mínima significativa (DMS) obtida do teste de Tukey ($p < 0,05$), foi realizada a comparação entre os diferentes sucos de acordo com a presença ou o tipo de agente adoçante utilizado.

4.11 Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa estatístico Statistica (Statsoft) versão 7.0. cujos resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão. Os gráficos foram elaborados por meio do programa OriginPro 7.5.

Fluxograma de produção do suco de laranja probiótico



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento e viabilidade do *L. casei* nas três formulações de suco

O crescimento e a viabilidade do *L. casei* foram significativamente ($p < 0,05$) maiores nos sucos que tiveram o pH corrigido a 6,5 (utilizando apenas NaOH ou NaOH e fosfato, formulações 2 e 3, respectivamente) do que no suco sem correção do pH (formulação 1), que apresentou pH de 3,85. Tais resultados corroboram com os de Silveira (2009), que observaram um crescimento ótimo do *L. casei* em suco de caju em pH de 6,5.

A alteração no sabor do suco ocasionada pela adição do fosfato, no entanto, fez com que a adição apenas de NaOH fosse considerada a melhor escolha para a correção do pH do suco elaborado neste estudo. Nas 3 formulações observou-se que o inóculo inicial de 10^7 UFC/mL foi o que apresentou maior crescimento e maior número de células viáveis do micro-organismo após a fermentação do suco.

Kun et al. (2008) ao estudarem o crescimento de *Bifidobacterium lactis* em suco de cenoura, verificaram que o inóculo de 10^7 UFC/mL propicia um maior número de células viáveis ao término de 24 h de fermentação quando comparado ao inóculo de 10^6 UFC/mL. Esses autores comentam que esse inóculo (10^7 UFC/mL) é ideal para uma rápida velocidade de crescimento do micro-organismo e garante a conservação natural do produto pela acidificação do mesmo.

Dessa forma, a correção do pH apenas com NaOH e o inóculo inicial de 10^7 UFC/mL foram escolhidos para a elaboração do suco nas diferentes condições de pH e temperatura delineadas pelo Planejamento Experimental.

5.2 Crescimento e viabilidade do *L. casei* nos ensaios do Planejamento Experimental

O *L. casei* teve seu crescimento em suco de laranja influenciado significativamente pelo pH e temperatura, para $p < 0,05$ conforme apresentado na tabela de efeitos (Anexo 4). Na temperatura de fermentação de 10,44°C (ensaio 7) não foi observado crescimento do micro-organismo, o que pode ser atribuído à sua característica mesófila. Os resultados de crescimento (g/L) e viabilidade (Log UFC/mL) são apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Crescimento (g/L) do *Lactobacillus casei* NRRL B-442 em suco de laranja após 24 h de fermentação.

Ensaio	pH inicial	T (°C) de fermentação	Crescimento (g/L)
1	4,70	15,00	0,09 ± 0,01
2	4,70	37,00	0,51 ± 0,06
3	6,70	15,00	0,06 ± 0,05
4	6,70	37,00	0,89 ± 0,04
5	4,29	26,00	0,10 ± 0,04
6	7,11	26,00	0,60 ± 0,07
7	5,70	10,44	0,00 ± 0,05
8	5,70	41,56	0,62 ± 0,06
9	5,70	26,00	0,42 ± 0,08
10	5,70	26,00	0,37 ± 0,05
11	5,70	26,00	0,37 ± 0,05

Através da análise da viabilidade do *L. casei* após 24 h de fermentação no suco de laranja, observa-se que esta foi influenciada significativamente pelo pH e temperatura ($p < 0,05$) conforme apresentado na tabela de efeitos (Anexo 4).

Tabela 3: Viabilidade (Log UFC/mL) do *Lactobacillus casei* NRRL B-442 em suco de laranja após 24 h de fermentação no suco de laranja.

Ensaio	pH inicial	T (°C) de fermentação	Viabilidade (Log UFC/mL)
1	4,70	15,00	7,11 ± 0,09
2	4,70	37,00	8,61 ± 0,12
3	6,70	15,00	7,57 ± 0,14
4	6,70	37,00	8,75 ± 0,06
5	4,29	26,00	8,14 ± 0,09
6	7,11	26,00	8,66 ± 0,11
7	5,70	10,44	6,84 ± 0,04
8	5,70	41,56	8,71 ± 0,07
9	5,70	26,00	8,87 ± 0,04
10	5,70	26,00	8,78 ± 0,07
11	5,70	26,00	9,06 ± 0,06

O ensaio 7 foi o único em que houve perda na contagem de células viáveis de *L. casei*, pois foram inoculadas 10^7 UFC/mL em todos os ensaios e, após 24 h de fermentação, esse ensaio apresentou uma contagem de $7 \cdot 10^6$ UFC/mL, confirmando que $10,44^\circ\text{C}$ não é uma temperatura favorável ao micro-organismo. Apesar disso, em todos os ensaios os sucos apresentaram resultados de Log UFC/mL acima de 6, o que corresponde a uma quantidade superior a 10^6 UFC/mL, que é o valor mínimo exigido pela legislação para leites fermentados. Esse valor foi usado como referência para o suco produzido neste trabalho uma vez que não existem parâmetros específicos para suco fermentado (BRASIL, 2000).

Kun et al (2008) ao estudarem o número de células viáveis de *B. lactis* em suco de cenoura, observaram que a contagem máxima desse micro-organismo foi atingida com 12 h de fermentação, com valores de 8,22 Log UFC/mL.

Os modelos de regressão obtido para o crescimento (g/L) e para a viabilidade (Log UFC/mL) estão expressos pelas Equações 2 e 3.

$$\text{Crescimento (g / L)} = 0,23 - 0,10 \text{ pH} - 0,0007 \text{ pH}^2 - 0,01T - 0,00018T^2 + 0,009 \text{ pH} \cdot T \quad (2)$$

$$\text{Viabilidade (LogUFC / mL)} = -6,84 + 3,47 \text{ pH} - 0,27 \text{ pH}^2 + 0,35T - 0,004T^2 - 0,007 \text{ pH} \cdot T \quad (3)$$

Onde:

pH = pH inicial do suco de laranja

T= Temperatura de fermentação

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido para o crescimento e viabilidade é apresentada nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. De acordo com a Tabela de ANOVA, o valor de F calculado para o modelo de crescimento (g/L) foi de 18,75 e para viabilidade (Log UFC/mL) foi de 115,0, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ Tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança. Assim, os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F .

Tabela 4: Análise de variância para o crescimento (g/L) do *L. casei* em suco de laranja fermentado (Eq. 02).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	0,75	5	0,15	18,75
Residual	0,04	5	0,008	
Total	0,79	10		
Coeficiente de determinação	0,95			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 5: Análise de variância para a viabilidade (Log UFC/mL) do *L. casei* em suco de laranja fermentado (Eq. 02).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	5,77	5	1,15	115,0
Residual	0,05	5	0,01	
Total	5,83	10		
Coeficiente de determinação	0,99			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

A análise da superfície de resposta para o crescimento (g/L) do *L. casei* (Figura 2) indica que nas temperaturas mais baixas o pH exerce pouca influência sobre o crescimento do micro-organismo, ou seja, independente do pH inicial do suco, o crescimento é baixo em baixas temperaturas. À medida que a temperatura de fermentação aumenta, o pH passa a exercer grande influência no crescimento, pois observa-se que o aumento do pH leva a um maior crescimento microbiano.

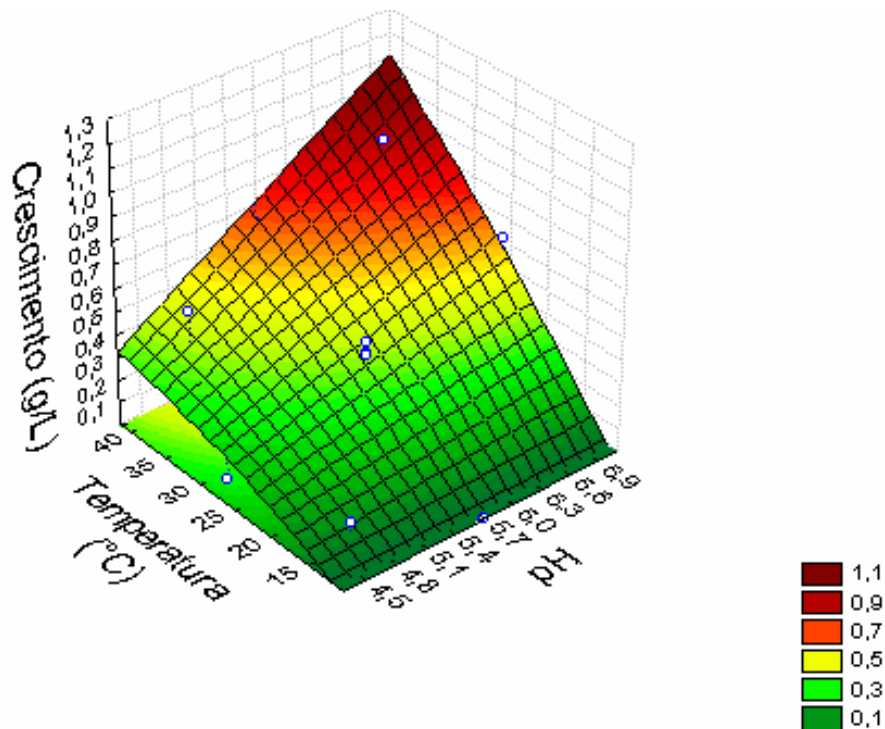


Figura 2: Superfície de resposta do crescimento (g/L) do *L. casei* NRRL B-442 em suco de laranja de acordo com pH inicial e T (°C) de fermentação.

Com relação à viabilidade (Figura 3), observa-se que a temperatura de fermentação exerce grande influência sobre a contagem de células viáveis do micro-organismo, pois em temperaturas de fermentação mais baixas a viabilidade é menor, aumentando à medida que a temperatura é elevada até atingir 30°C, temperatura onde foi observada a viabilidade máxima do *L. casei* B-422 no suco de laranja fermentado. A partir de 30°C, o aumento da temperatura leva a uma redução da viabilidade. A ponto ótimo para viabilidade do *L. casei* é obtido em pH 6,0 e temperatura de fermentação de 30°C.

Nancib et al. (2009) encontraram resultados semelhantes ao estudarem a produção de ácido láctico por diferentes micro-organismos em extratos de sucos. Esses autores observaram que os valores da concentração da biomassa do *L. casei* e a produtividade de ácido láctico são maiores quando a temperatura de fermentação é 30°C.

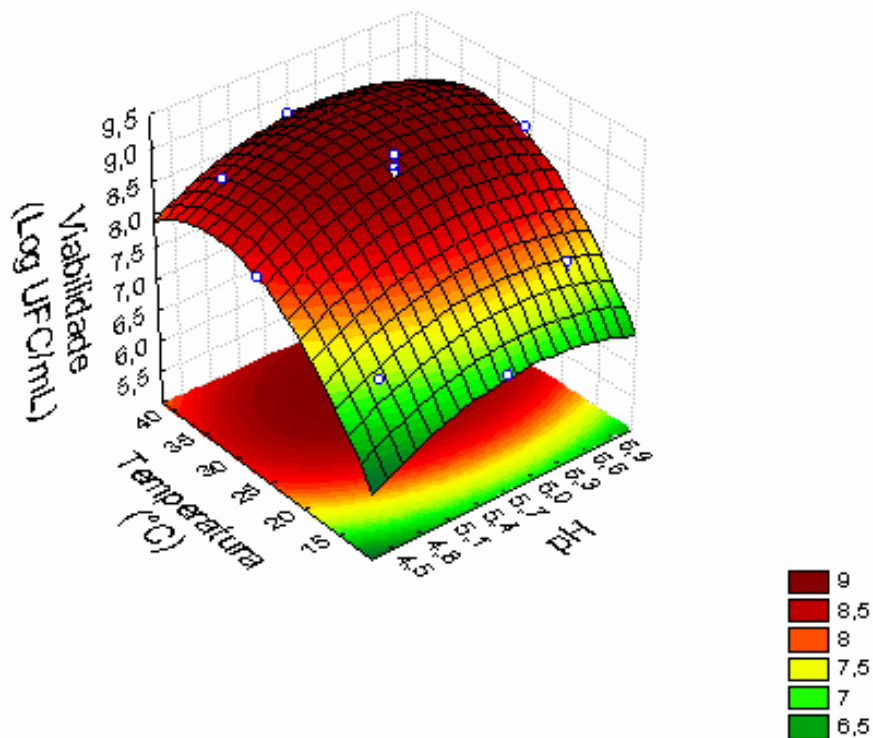


Figura 3: Superfície de resposta da viabilidade (Log UFC/mL) do *L. casei* NRRL B-442 em suco de laranja de acordo com pH inicial e T (°C) de fermentação.

A redução do pH ao longo do período de estocagem (Tabela 6) indica que o micro-organismo utilizou os açúcares naturalmente existentes no suco de laranja e que não foram consumidos durante a fermentação para produzir ácido láctico. Em todos os ensaios foi inoculada uma concentração de Log UFC igual a 7 de *L. casei*/mL (10^7 UFC/mL) no suco de laranja, e após a estocagem todos apresentaram acima de 8 Log UFC/mL ($> 10^8$ UFC/mL) demonstrando que o *L. casei* além de ter crescido no suco de laranja durante a estocagem a 4°C, manteve-se viável após 45 dias de armazenamento. Assim como ocorreu após a fermentação, os valores obtidos após a estocagem são superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira para produtos lácteos fermentados (10^6 UFC/mL).

Tabela 6: Crescimento (g/L) e da viabilidade (Log UFC/mL) do *Lactobacillus casei* NRRL B-442 em suco de laranja após estocagem a 4°C por 45 dias.

Ensaio	pH após 45 dias de estocagem	Crescimento após estocagem (g/L)	Viabilidade após 45 dias estocagem (Log UFC/mL)
1	3,98	1,13 ± 0,11	8,84 ± 0,07
2	3,71	0,05 ± 0,08	8,75 ± 0,10
3	4,12	0,80 ± 0,14	8,76 ± 0,11
4	4,05	0,23 ± 0,06	9,20 ± 0,01
5	3,62	0,88 ± 0,06	9,04 ± 0,05
6	4,1	0,42 ± 0,05	9,08 ± 0,11
7	4,23	1,13 ± 0,01	8,46 ± 0,01
8	4,02	0,09 ± 0,04	9,03 ± 0,04
9	3,93	0,62 ± 0,05	9,31 ± 0,02
10	4,02	0,22 ± 0,08	9,33 ± 0,07
11	3,91	0,24 ± 0,01	9,26 ± 0,00

Yoon et al. (2004) ao estudarem o comportamento de bactérias ácido lácticas em suco de tomate, observaram que *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. delbrueckii* cresceram rapidamente nessa bebida, reduzindo os níveis de açúcares, com elevação na produção de ácido láctico. Apesar do pH do suco após 72h de fermentação ter sido reduzido a 3,5, a viabilidade das culturas lácticas permaneceu acima de 10⁶UFC/mL após 4 semanas de estocagem a 4°C.

Buriti et al. (2007) ao estudarem a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* em mousses de frutas, observaram que esta diminui ao longo do período de refrigeração, mostrando que a adição de frutas aos produtos probióticos deve ser cuidadosamente planejada, uma vez que pode haver inibição das cepas probióticas.

Champagne; Gardner (2008) observaram que diferentes espécies do gênero *Lactobacillus* mantiveram-se viáveis (com contagem acima de 10⁶ UFC/mL) após serem adicionadas em sucos de frutas e estocadas a 4°C por 80 dias. Ao correlacionarem a viabilidade com o pH, verificaram que em sucos com pH de 4,2 o

crescimento das bactérias probióticas é maior do que nos sucos com pH de 3,6, 3,8 e 4,0, mostrando que quanto maior o pH do suco, maior o número de células viáveis.

Champagne et al. (2008) avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 em suco de frutas a base de maçã e concluíram que essa permanece elevada (acima de 10^9 UFC/mL) após 4 semanas de estocagem sob refrigeração. Esses autores observaram que à medida que o número de semanas de estocagem aumenta, a viabilidade diminui.

5.3 Crescimento e viabilidade do *L. casei* no suco de laranja em função do inóculo

A viabilidade após as 24 h de fermentação nos sucos inoculados com 1mL (correspondente a 10^7 UFC/mL de suco), 2mL (correspondente a $2 \cdot 10^7$ UFC/mL de suco) e 3mL (correspondente a $3 \cdot 10^7$ UFC/mL de suco) de MRS ativado foi, respectivamente, $3,3 \cdot 10^9$ UFC/mL, $6,4 \cdot 10^9$ UFC/mL e $4,9 \cdot 10^9$ UFC/mL. Com relação ao pH do suco ao final das 24 h de fermentação a 30°C, os valores encontrados foram, respectivamente, 4,60, 4,32 e 4,23.

Apesar de o suco adicionado com 3mL de MRS ativado ter uma maior biomassa do início ao final da fermentação, observa-se que a contagem de células viáveis nesse suco foi menor do que a do suco adicionado de 2mL de MRS ativado. Isso pode ser atribuído à perda da viabilidade de algumas células durante a fermentação, fazendo com que a biomassa permanecesse elevada, apesar das células não estarem mais viáveis.

Considerando o inóculo que apresentou maior viabilidade do *L. casei* após a fermentação e os resultados da Tabela 7, que apresenta a biomassa (g/L) de *L. casei* e o pH ao longo da fermentação, optou-se pela adição de 2mL de MRS ativado para a elaboração do suco de laranja, uma vez que essa quantidade propiciou um valor de pH ao término da fermentação favorável à conservação do suco, bem como uma maior viabilidade do micro-organismo.

Tabela 7: Biomassa (g/L) do *L. casei* e pH do suco de laranja durante 24 h de fermentação a 30°C de acordo com quantidade de inóculo.

Tempo (horas)	1mL de MRS ativado		2mL de MRS ativado		3mL de MRS ativado	
	pH	Biomassa (g/L)	pH	Biomassa (g/L)	pH	Biomassa (g/L)
0	6,00	0,99 ± 0,01	6,00	1,04 ± 0,01	6,00	1,01 ± 0,01
2	5,96	0,99 ± 0,00	5,91	1,04 ± 0,00	5,87	1,01 ± 0,01
4	5,91	1,02 ± 0,01	5,82	1,11 ± 0,01	5,78	1,10 ± 0,01
6	5,87	1,11 ± 0,01	5,73	1,20 ± 0,00	5,59	1,17 ± 0,01
8	5,75	1,24 ± 0,00	5,55	1,29 ± 0,01	5,45	1,27 ± 0,01
10	5,54	1,27 ± 0,00	5,28	1,32 ± 0,01	5,10	1,45 ± 0,01
12	5,42	1,36 ± 0,04	4,94	1,52 ± 0,01	4,84	1,53 ± 0,01
14	5,10	1,40 ± 0,01	4,87	1,55 ± 0,01	4,64	1,66 ± 0,01
16	4,89	1,53 ± 0,01	4,62	1,65 ± 0,01	4,60	1,80 ± 0,01
18	4,77	1,52 ± 0,00	4,51	1,65 ± 0,01	4,39	1,80 ± 0,01
20	4,74	1,59 ± 0,01	4,50	1,68 ± 0,01	4,32	1,81 ± 0,01
22	4,69	1,62 ± 0,02	4,43	1,71 ± 0,03	4,30	1,82 ± 0,01
24	4,6	1,60 ± 0,01	4,32	1,74 ± 0,01	4,23	1,83 ± 0,01

5.4 Crescimento do *L. casei* no suco de laranja de acordo com o tempo de fermentação

A fim de verificar a influência do tempo de fermentação no crescimento do micro-organismo, foram selecionados dois pontos do Planejamento Experimental (pH 6,7 e T=37°C; pH 4,7 e T=37°C) para elaboração do suco de laranja fermentado nessas condições, com medição do crescimento do *L. casei* a cada 2 h durante 24 h de fermentação.

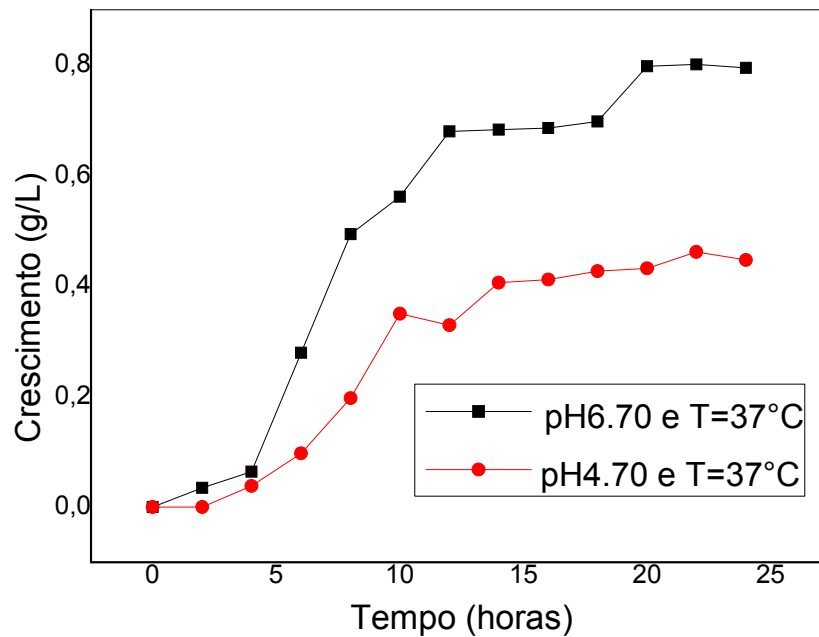


Figura 4: Crescimento (g/L) do *L. casei* no suco de laranja ao longo de 24 h de fermentação.

Os resultados expressos na Figura 4 mostram que nas primeiras 4 h de fermentação o micro-organismo apresenta baixo crescimento, caracterizando a sua fase lag ou de adaptação. A partir daí, o crescimento é acelerado até 12 h de fermentação, quando volta a ficar lento e para a partir da vigésima hora de fermentação do suco. Uma vez que entre 20 e 24 h de fermentação não foi observado crescimento significativo do micro-organismo, optou-se por reduzir o número de horas de fermentação do suco de laranja para 20 h.

Silveira (2009) refere que as BAL crescem bem em ambientes neutros ou próximo à neutralidade, com pH variando entre 5.5 – 7.5, essa autora verificou que o pH 6,5 foi o que propiciou maior crescimento do *L. casei*. Isto pode explicar o maior crescimento em pH 6,7 quando comparado ao do pH 4,7 (Figura 4).

Faria et al. (2006) a estudarem os parâmetros para produção de leite fermentado de búfala, observaram que o tempo de fermentação de 18 horas não foi suficiente para alcançar o valor mínimo de acidez (0,6%), enquanto 22 e 24 h de fermentação propiciaram acidez entre 0,6 e 2,0%, mesmo após 30 dias de

armazenamento. Esses autores comentam que o *L. casei* apresenta pós-acidificação lenta, característica desejável para garantir viabilidade no produto durante a estocagem.

5.5 Crescimento e viabilidade do *L. casei* no suco de laranja otimizado

Após obter os resultados dos parâmetros que propiciam as melhores condições para o crescimento e a viabilidade do *L. casei*, foi elaborado o suco de laranja fermentado nas condições otimizadas: temperatura de fermentação 30°C; pH 6,0; inóculo $2 \cdot 10^7$ UFC/mL e tempo de fermentação 20 h.

Os resultados para biomassa (g/L) são expressos na Tabela 8 e Figura 5, mostrando um elevado crescimento do micro-organismo ao longo da fermentação, sendo mais acelerado (fase log) entre 6 e 12 h. Esses resultados confirmam os encontrados no item 5.3 para a biomassa com inóculo de $2 \cdot 10^7$ UFC/mL e no item 5.4 para a curva de crescimento do *L. casei* no suco de laranja.

Tabela 8: Biomassa (g/L) do *L. casei* NRRL B-442 ao longo das 20 h de fermentação do suco de laranja otimizado (pH=6,0 e T=30°C).

Tempo de Fermentação (h)	Biomassa (g/L)
0	1,08 ± 0,02
2	1,17 ± 0,00
4	1,17 ± 0,01
6	1,21 ± 0,02
8	1,35 ± 0,02
10	1,48 ± 0,01
12	1,61 ± 0,00
14	1,61 ± 0,01
16	1,63 ± 0,01
18	1,64 ± 0,01
20	1,66 ± 0,01

Alguns autores ao estudarem o crescimento de BAL em sucos vegetais fermentados a uma temperatura igual à utilizada neste trabalho (30°C) observaram que esses micro-organismos são capazes de crescer bem nesses substratos. Yoon et al. (2004) observaram que o *L. casei* cresceu rapidamente em suco de tomate, sendo capaz de manter a viabilidade acima de 10^8 UFC/mL após 48 h de fermentação a 30°C. Após 48 h de fermentação de suco de repolho a 30°C, as BAL *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. plantarum* foram capazes de crescer bem no suco sem suplementação de nutrientes, apresentando viabilidade próxima a 10^8 UFC/mL (YOON et al., 2006).

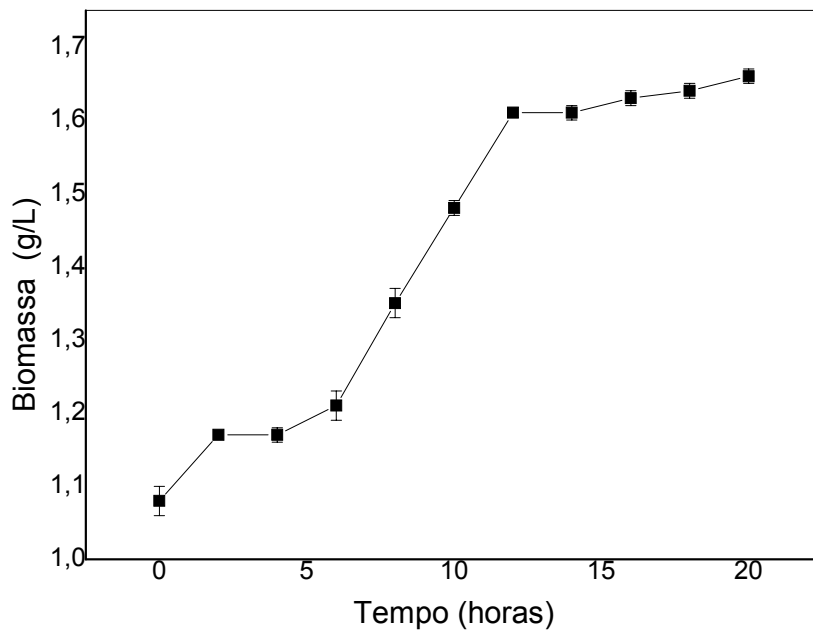


Figura 5: Biomassa (g/L) do *L. casei* NRRL B-442 ao longo das 20 h fermentação do suco de laranja otimizado.

De acordo com a Tabela 9 e a Figura 6, observa-se que o número de células viáveis do *L. casei* ao final das 20 h de fermentação era de $2,4 \cdot 10^9$ UFC/mL (9,38 Log UFC/mL), essa contagem aumentou gradualmente para $5,7 \cdot 10^9$ UFC/mL do início até a quarta semana de estocagem a 4°C. A partir daí, ocorreu uma redução no número de UFC/mL, que passou de $5,7 \cdot 10^9$ para $3,3 \cdot 10^9$. Apesar da redução observada, o número de células viáveis do micro-organismo ao final da sexta semana de estocagem permaneceu acima de 10^9 UFC/mL (9 Log UFC/mL), sendo este um ótimo valor para produtos fermentados contendo probióticos (SHAH, 2007).

Qizhou et al. (2009) ao produzirem leite fermentado com *L. casei*, observaram que após 24 h de fermentação, o produto inoculado com 2.10^7 de *L. casei* apresentou viabilidade do micro-organismo de 8,59 Log UFC/mL.

Tabela 9: Biomassa (g/L) e viabilidade (Log UFC/mL) do *L. casei* NRRL B-442 ao longo do armazenamento do suco de laranja fermentado sob refrigeração.

Tempo de Estocagem (dias)	Biomassa (g/L)	Viabilidade (Log UFC/mL)
0	1,65 ± 0,01	9,38 ± 0,07
7	1,75 ± 0,00	9,46 ± 0,04
14	1,84 ± 0,01	9,64 ± 0,03
21	1,97 ± 0,01	9,64 ± 0,02
28	1,98 ± 0,01	9,76 ± 0,05
35	2,19 ± 0,01	9,52 ± 0,04
42	2,62 ± 0,01	9,52 ± 0,02

Faria et al. (2006) ao pesquisarem a viabilidade de *L. casei* em leite fermentado de búfala após fermentação verificaram valores de (log UFC mL⁻¹) de 9,62±0,55, para 22 horas, e 9,97±0,97, para 24 horas. Os valores (Log UFC/mL) após 30 dias de estocagem foram 8,99±0,35 para 22 horas de fermentação, e 8,99±0,59 para 24 horas de fermentação. Gilliland et al. (2002) observaram redução na contagem de *L. casei* em iogurte ao longo da estocagem sob refrigeração, com valores de 6,70; 6,29; 6,13; 6,01; 5,99 e 5,98 Log UFC/mL com 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de estocagem. Esses valores são inferiores aos encontrados neste trabalho.

Korbekandi et al. (2008) observaram que a viabilidade do *L. casei* reduziu gradualmente ao longo do armazenamento de iogurte probiótico, apresentando uma contagem de $1,77. 10^7$ UFC/mL após 21 dias de estocagem a 5° C. Essa viabilidade é inferior à encontrada neste trabalho após 21 dias de estocagem. Saccaro et al. (2009) ao elaborarem iogurte com adição de *L. acidophilus* além das culturas *starter*, observaram que no após a fermentação o número de células viáveis do probiótico era 7,17 Log UFC/mL, declinando 6,01; 5,26 e < 5,00 Log UFC/mL após 7, 14 e 21

dias de estocagem a 4°C. Esses autores atribuem essa redução da viabilidade ao antagonismo entre as bactérias *starter* e o micro-organismo probiótico.

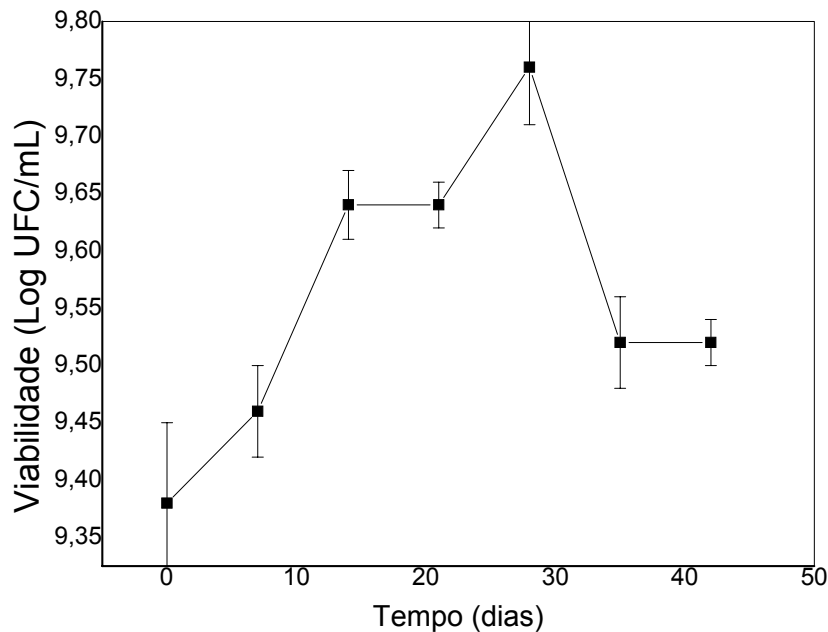


Figura 6: Viabilidade (Log UFC/mL) do *L. casei* NRRL B-442 ao longo de 42 dias de estocagem do suco de laranja otimizado armazenado sob refrigeração a 4°C.

Yoon et al. (2004) comentam que os principais fatores para a redução da viabilidade dos organismos probióticos são a redução do pH do meio e o acúmulo de ácidos orgânicos com resultado da fermentação. Yoon et al. (2005) avaliaram a viabilidade do *L.casei*, *L. plantarum* e *L. delbrueckii* em suco de beterraba fermentado a 30°C por 72 h após estocagem sob refrigeração e constataram que o número de células viáveis desses micro-organismos foi gradualmente reduzido quando armazenados a 4°C, mas permaneceram com contagem acima de 10^8 UFC/mL após 4 semanas de estocagem. Esses autores enfatizam que é importante ter um número significativo de bactérias lácticas viáveis no produto final para obter os máximos efeitos benéficos.

O *L. casei* não sobreviveu às condições de baixo pH e elevada acidez do suco de repolho fermentado, perdendo completamente a viabilidade após 2 semanas de estocagem sob refrigeração. A viabilidade pode ter sido afetada pela produção de substâncias inibitórias produzidas durante a estocagem (YOON et al., 2006). Durante a estocagem sob refrigeração de suco de tomate fermentado, a

contagem de células viáveis de *L. casei* diminuiu discretamente, mas permaneceu consideravelmente elevada ($>10^6$ UFC/mL) após 4 semanas de armazenamento a 4°C (YOON et al., 2004).

Pode-se observar na Figura 7 que durante todo o período de estocagem houve crescimento da biomassa, não acompanhando o declínio da curva de viabilidade (Figura 6), ou seja, a biomassa no suco permaneceu elevada, mas algumas células não mais estavam viáveis.

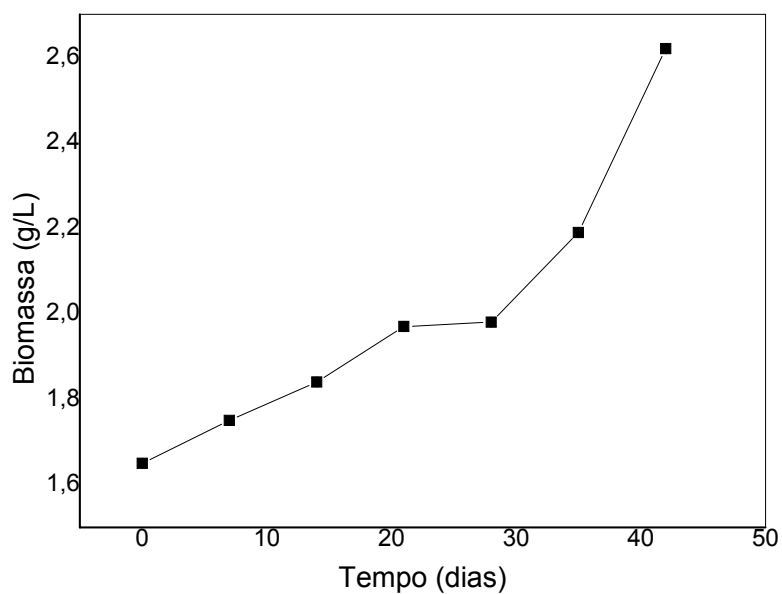


Figura 7: Biomassa (g/L) do *L. casei* NRRL B-442 ao longo de 42 dias de estocagem do suco de laranja otimizado armazenado sob refrigeração a 4°C.

5.6 Teor de açúcares no suco de laranja otimizado

Os açúcares naturalmente presentes no suco de laranja, já que o mesmo não foi adicionado de açúcar, foram parcialmente consumidos durante a fermentação, caracterizando o metabolismo das BAL que utilizam açúcares para a produção de ácido láctico. As concentrações dos principais carboidratos presentes no suco de laranja ao longo da fermentação são apresentadas na Tabela 10 e Figura 8.

Tabela 10: Concentração (g/L) de açúcares no suco de laranja com *L. casei* NRRL B-442 ao longo das 20 h de fermentação.

Tempo de Fermentação (h)	Concentração de sacarose (g/L)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de frutose (g/L)
0	30,29 ± 0,23	14,38 ± 0,20	20,03 ± 0,19
2	24,32 ± 0,51	13,40 ± 1,03	16,24 ± 0,53
4	21,73 ± 0,03	12,83 ± 0,72	15,82 ± 1,25
6	21,02 ± 0,05	12,11 ± 0,02	12,67 ± 0,04
8	19,92 ± 0,06	11,04 ± 0,04	12,55 ± 0,28
10	19,34 ± 0,05	11,75 ± 0,84	11,89 ± 0,38
12	19,19 ± 0,03	10,10 ± 0,06	11,76 ± 0,21
14	18,27 ± 0,03	8,78 ± 0,03	11,46 ± 0,03
16	18,27 ± 0,05	8,73 ± 0,06	10,29 ± 0,04
18	18,17 ± 0,05	8,63 ± 0,02	10,22 ± 0,02
20	18,12 ± 0,03	8,55 ± 0,03	9,92 ± 0,18

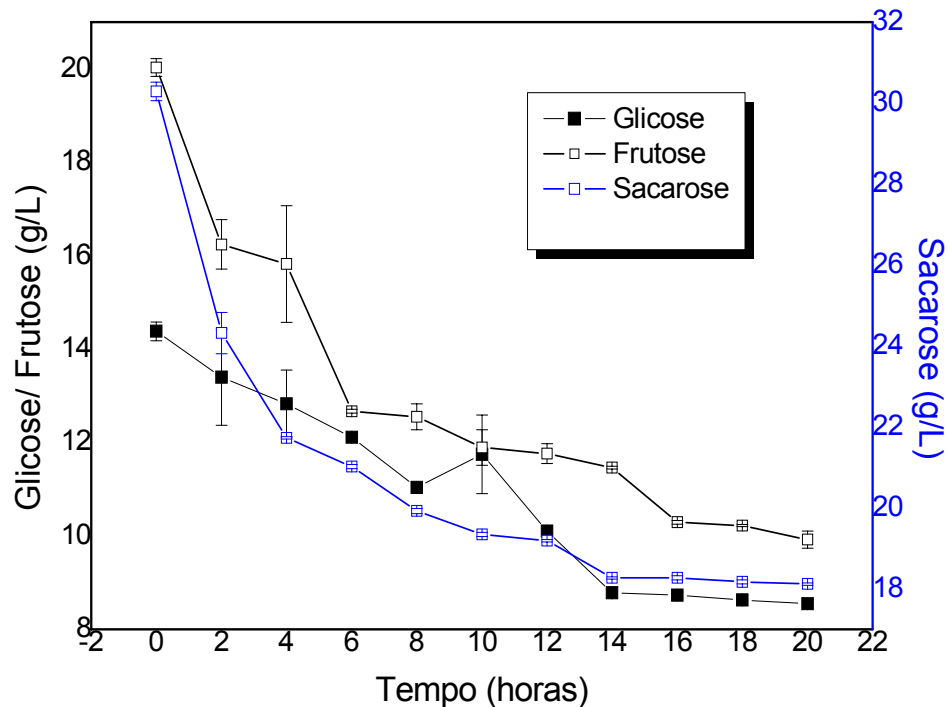


Figura 8: Concentração (g/L) de açúcares no suco de laranja com *L. casei* NRRL B-442 ao longo das 20 h de fermentação.

Ao longo da fermentação foram consumidos 40,17%, 40,51% e 50,46% de sacarose, glicose e frutose, respectivamente. Observa-se na Tabela 11 que no início da fermentação há um maior consumo de sacarose e frutose em relação à glicose. Após 14 h de fermentação, a utilização desses açúcares pelo *L. casei* diminui, o que pode ser explicado por um menor crescimento do micro-organismo nas últimas horas de fermentação (Figura 5).

Yoon et al. (2004) comentam que as BAL, como *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. delbrueckii*, ao fermentarem o suco de tomate, rapidamente reduzem os níveis de açúcares do suco, utilizando-os como substrato para a fermentação, reduzindo os teores de glicose de 32,4g/L para 25,2g/L após 24 h de fermentação, ou seja, consumiram 22% da glicose presente no suco de tomate.

Tabela 11: Percentual de açúcares do suco de laranja ao longo da fermentação a 30°C.

Tempo de Fermentação (h)	% de sacarose ao longo da fermentação	% de glicose ao longo da fermentação	% de frutose ao longo da fermentação
0	100%	100%	100%
2	80,29%	93,18%	81,07%
4	71,73%	89,20%	78,98%
6	69,39%	84,22%	63,26%
8	65,76%	76,76%	62,63%
10	63,85%	81,74%	59,35%
12	63,35%	70,20%	58,73%
14	60,33%	61,07%	57,23%
16	60,33%	60,71%	51,38%
18	60,00%	60,03%	51,04%
20	59,83%	59,49%	49,54%

Nancib et al. (2009) estudaram a utilização de açúcares por *L. casei* em extratos de sucos e observaram que após 19 h de fermentação a proporção de utilização de glicose foi de 82,2%. Com relação à frutose, esses autores também observaram uma redução durante as 19 h de fermentação, sendo 94,4% da quantidade total de frutose utilizada.

Kun et al. (2008) verificaram que a *B. lactis* utilizou bem glicose e sacarose durante a fermentação do suco de cenoura, reduzindo os seus valores após 12 h de fermentação em 20% e 10%, respectivamente. No entanto, as concentrações de frutose não foram alteradas, sugerindo que este açúcar não é bem utilizado por esta bactéria.

Por meio da Tabela 12 e Figura 9, observa-se que durante o armazenamento por 42 dias sob refrigeração os açúcares do suco de laranja fermentado continuaram sendo lentamente consumidos, o que pode ser explicado pela elevada contagem de *L. casei* que se mantiveram viáveis ao longo da estocagem.

Tabela 12: Concentração de açúcares do suco de laranja fermentado ao longo da estocagem sob refrigeração.

Tempo de Estocagem (dias)	Concentração de sacarose (g/L)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de frutose (g/L)
0	18,12 ± 0,03	8,55 ± 0,03	9,92 ± 0,18
7	17,92 ± 0,26	8,44 ± 0,02	9,88 ± 0,01
14	17,10 ± 0,03	8,34 ± 0,04	9,85 ± 0,16
21	17,10 ± 0,03	7,99 ± 0,05	9,77 ± 0,11
28	10,27 ± 0,03	7,79 ± 0,02	9,4 ± 0,11
35	3,85 ± 0,05	6,78 ± 0,07	8,75 ± 0,05
42	3,34 ± 0,00	4,77 ± 0,01	4,5 ± 0,28

Ao longo de 42 dias de armazenamento foram consumidos 81,55%, 44,14% e 54,62% de sacarose, glicose e frutose, respectivamente. Observa-se na Tabela 13 o percentual desses três açúcares no suco a cada semana de estocagem.

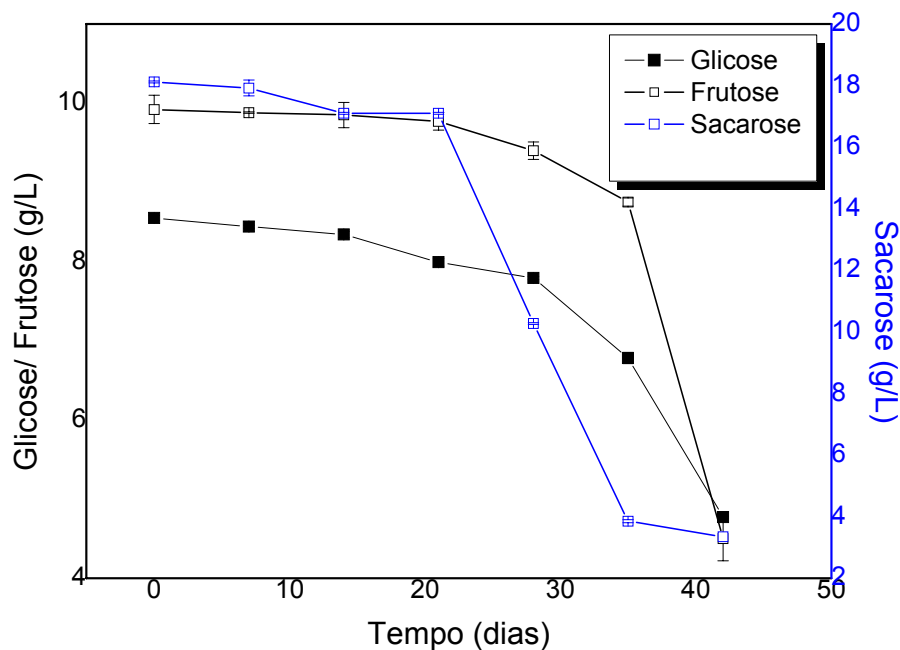


Figura 9: Concentração (g/L) de açúcares no suco de laranja com *L. casei* NRRL B-442 ao longo de 42 dias de estocagem sob refrigeração.

Tabela 13: Percentual de açúcares do suco de laranja fermentado ao longo da estocagem sob refrigeração.

Tempo de Estocagem (dias)	% de sacarose ao longo da estocagem	% de glicose ao longo da estocagem	% de frutose ao longo da estocagem
0	100%	100%	100%
7	98,89%	98,68%	99,59%
14	97,49%	97,54%	99,27%
21	94,40%	93,43%	98,45%
28	56,68%	91,07%	94,73%
35	21,25%	79,29%	88,23%
42	18,45%	55,86%	45,38%

5.7 Teor de ácidos no suco de laranja otimizado

A tabela 14 e a Figura 10 apresentam a redução do pH do suco ao longo da fermentação, bem como a produção de ácido láctico observada nesse período. A acidificação do meio, observada no processo fermentativo, justifica o uso deste como agente de conservação do suco, pois ao término da fermentação o mesmo apresentou o pH de 4,32.

De acordo Vlieg; Hugenholtz (2007), as Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são assim denominadas por fermentarem açúcares, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo. Elas agem acidificando os produtos alimentares, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e aumentando o período de conservação dos produtos fermentados em relação à matéria-prima não fermentada (FARIA et al., 2006).

Tabela 14: Concentração de ácido láctico (g/L) e pH do suco durante a fermentação do suco de laranja com *L. casei* NRRL B-442.

Tempo de Fermentação (h)	Ácido láctico (g/L)	pH
0	<LQ	6,00
2	<LQ	5,87
4	<LQ	5,78
6	<LQ	5,60
8	0,49 ± 0,01	5,32
10	1,27 ± 0,00	5,06
12	1,99 ± 0,01	4,76
14	2,50 ± 0,07	4,65
16	3,08 ± 0,04	4,43
18	3,45 ± 0,01	4,38
20	3,67 ± 0,04	4,32

*<LQ : menor que o limite de quantificação

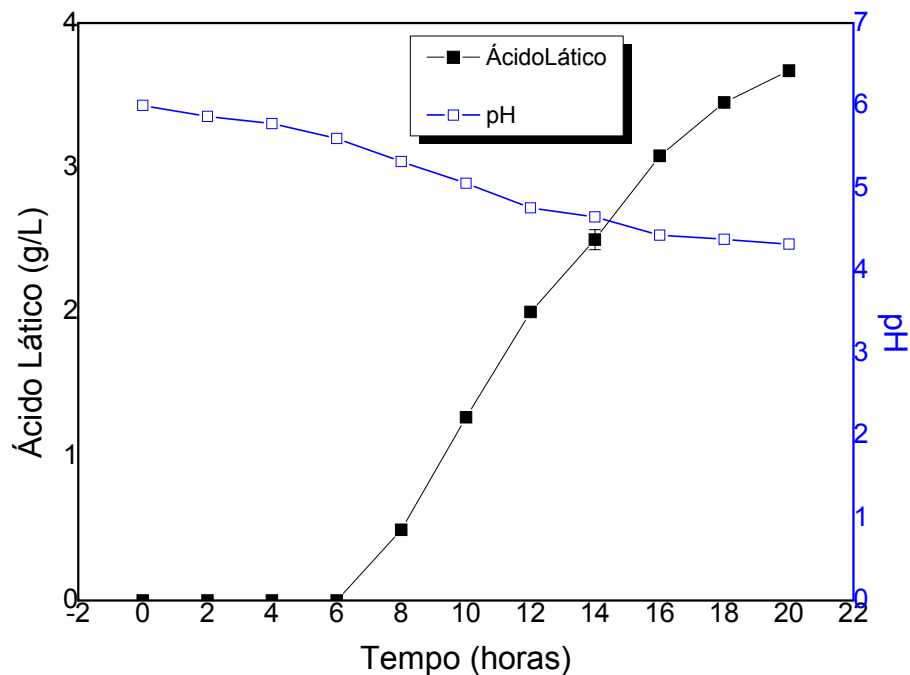


Figura 10: Concentração (g/L) de ácido láctico e variação do pH no suco de laranja ao longo das 20 h de fermentação.

Qizhou et al. (2009) verificaram que o pH do leite fermentado com *L. casei* reduziu ao longo da fermentação, apresentando valores de 6,10; 5,44; 4,89; 4,71 e 4,50 com 0,6,12, 18 e 24 horas de fermentação, respectivamente. Korbekandi et al. (2008) ao utilizarem cultura de *L. casei* durante a produção de iogurte probiótico, observaram que após 5 h de fermentação o pH do produto reduziu de 6,6 para 4,6.

Yoon et al. (2004) ao estudarem a fermentação do suco de tomate com *L. casei*, observaram que o micro-organismo reduziu o pH inicial do suco de 4,1 para valores inferiores a 3,5 após 72 h de fermentação, não sendo necessária a correção do pH e suplementação de nutrientes para o crescimento dessa bactéria.

Yoon et al. (2005) ao estudarem o comportamento das BAL em suco de beterraba, observaram que *L. acidophilus* e *L. plantarum* reduziram o pH inicial do suco de 6,3 para baixo de 4,5 após 48 h de fermentação, enquanto o *L. casei* e o *L. delbrueckii* reduziram o pH até 5,0 após 72 h de fermentação, pois estes têm menor habilidade em produzir ácido láctico.

A Tabela 15 apresenta os valores da produção de ácido láctico durante o armazenamento sob refrigeração ao longo de 42 dias. No início da estocagem (correspondente a 20 horas de fermentação) a concentração de AL era de 3,67 g/L, já ao final de 42 dias a concentração de AL era de 8,24 g/L, representando um crescimento de 224% em relação ao teor de ácido láctico no início da estocagem.

Tabela 15: Concentração de ácido láctico (g/L) e pH do suco ao longo do armazenamento do suco de laranja fermentado com *L. casei* NRRL B-442.

Tempo de Estocagem (dias)	Concentração de ácido láctico (g/L)	% de ácido láctico ao longo da estocagem	pH
0	3,67 ± 0,04	100%	4,32
7	3,74 ± 0,07	101,9%	4,15
14	5,4 ± 0,04	147,1%	4,11
21	6,47 ± 0,18	174,4%	4,07
28	7,17 ± 0,07	195,4%	3,95
35	7,99 ± 0,03	217,7%	3,88
42	8,24 ± 0,01	224,5%	3,88

Qizhou et al. (2009) verificaram que o pH do leite fermentado com *L. casei* reduziu ao longo da estocagem sob refrigeração, apresentando valores de 4,50, 4,48, 4,46, 4,31 e 4,15 com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem. Korbekandi et al. (2008) observaram que o iogurte com *L. casei* após 21 dias de armazenamento a 5° C teve o seu pH reduzido de 4,6 para 4,46.

Faria et al. (2006) ao fermentarem leite de búfala com *L. casei*, observaram que após 22 e 24 horas de fermentação o pH dos leites foram 5,35±0,03 e 5,02±0,06, respectivamente. Após 30 dias de refrigeração esses valores caíram para 4,72±0,11 e 4,45±0,07, respectivamente. Esses autores comentam que o pH do produto pode chegar a 4,0 durante sua vida-de-prateleira, sem ter um efeito prejudicial sobre a viabilidade das bactérias probióticas.

Guo et al. (2009) observaram que após 24 h de fermentação o *L. casei* reduziu o pH do leite fermentado para 5,59 e após 28 dias de estocagem sob refrigeração o pH atingiu o valor de 4,60, indicando que o micro-organismo tem a habilidade produzir ácido mesmo em temperaturas de refrigeração. Akalin et al. (2004) observaram que culturas probióticas reduziram o pH de iogurtes de 4,51 para 4,4 após 28 dias de estocagem sob refrigeração a 4° C, sendo a redução do pH acompanhada por redução na contagem de células viáveis.

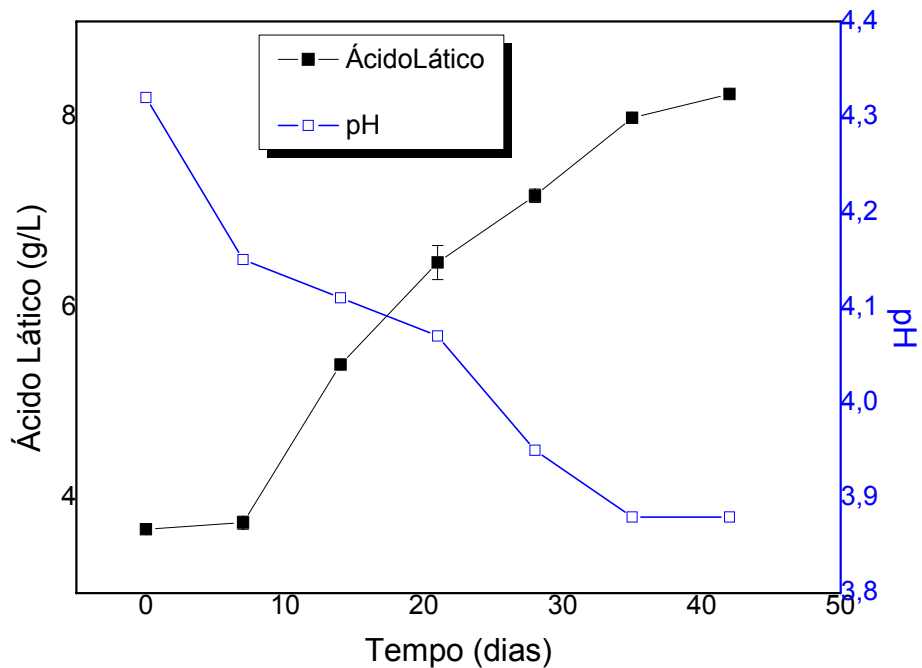


Figura 11: Concentração (g/L) de ácido láctico e variação do pH no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento sob refrigeração.

A perda de ácido ascórbico no suco de laranja fermentado ao longo da estocagem sob refrigeração é apresentada na Tabela 16 e Figura 11. Pode-se observar que após 42 dias de armazenamento o teor de vitamina C do suco foi reduzido em 18,83%, passando de uma concentração inicial de 730,7mg/L para uma concentração final de 593,12mg/L.

A temperatura de estocagem é considerada o fator mais importante na estabilidade e qualidade dos sucos cítricos, sendo o fator predominante na degradação do ácido ascórbico por via anaeróbia. O teor de vitamina C diminui com o aumento do tempo e temperatura de estocagem (BELTRAN et al., 2009;

RAIMUNDO et al., 2007), sendo o primeiro fator o provável responsável pela redução de AA no suco de laranja fermentado, uma vez que a temperatura manteve-se constante durante toda a estocagem.

Tabela 16: Concentração (mg/L) de ácido ascórbico e percentual de perda da vitamina ao longo do armazenamento do suco de laranja fermentado com *L. casei* NRRL B-442.

Tempo de Estocagem (dias)	Concentração de ácido ascórbico (mg/L)	% de ácido ascórbico ao longo da estocagem
0	730,70 ± 0,36	100
7	683,57 ± 0,36	93,55
14	672,74 ± 2,9	92,07
21	671,47 ± 1,3	91,93
28	663,18 ± 0,63	90,76
35	661,91 ± ,27	90,59
42	593,12 ± 0,00	81,17

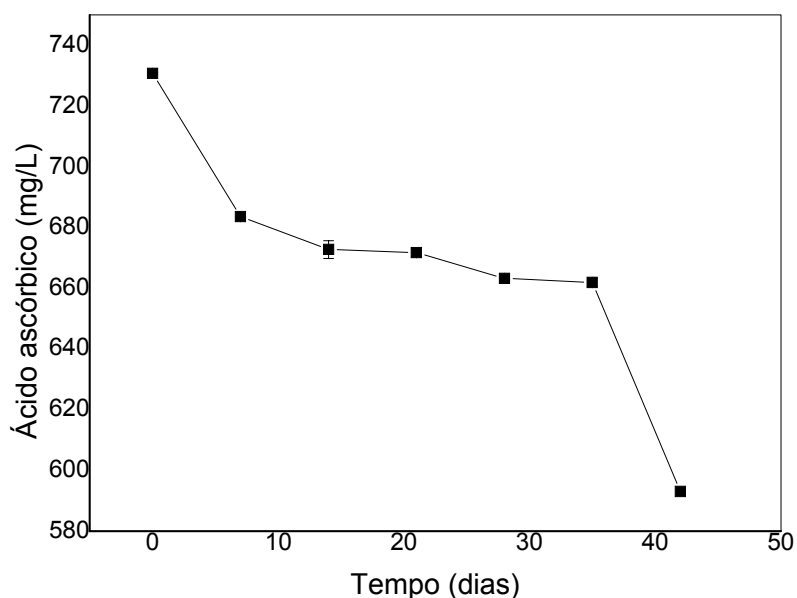


Figura 12: Concentração de ácido ascórbico (mg/L) no suco de laranja fermentado ao longo do armazenamento sob refrigeração.

Beltrán et al. (2009) comentam que o Comitê de Experts da Associação Européia de Produtores de Sucos Cítricos estabelece um teor mínimo de concentração de vitamina C nos sucos de laranja de 300mg/L, que deve ser mantido por toda a vida de prateleira desses produtos. A quantidade de AA encontrada no presente trabalho, mesmo após a fermentação e estocagem, foi superior a este valor. Kabasakalis et al. (2000) ao avaliarem as perdas de ácido ascórbico em suco de laranja, observaram que após 10 dias de estocagem sob refrigeração o suco perdeu 12,5% de seu conteúdo original de vitamina C, que era 424,0mg/L. Após 4 meses a perda foi de 28,9%. Beltrán et al. (2009) ao avaliarem o teor de vitamina C ao longo da estocagem de suco de laranja, observaram uma concentração inicial da vitamina no suco de $520,1 \pm 0,7$ mg/L e concentrações finais de $340,3 \pm 0,5$ mg/L e $160,2 \pm 0,1$ mg/L após 35 dias de armazenamento sob refrigeração e temperatura ambiente, respectivamente.

Garcia-Alonso et al. (2009) estudaram as perdas de vitamina C no suco de tomate e observaram um teor inicial da vitamina de 680mg/L e perda de 50% após dois, oito e doze meses de estocagem a 37°C, 22°C e 8°C, respectivamente. Tais resultados confirmam que a conservação sob refrigeração reduz as perdas de ácido ascórbico.

Dhaliwal; Hira (2004) ao estudarem perdas vitamínicas em sucos de cenoura acondicionados em garrafas de vidro e armazenados a temperatura ambiente, observaram que após 6 meses de estocagem houve perda de 80% de ácido ascórbico.

Beltrán et al. (2009) comentam que as bebidas e sucos de frutas devem ser cuidadosamente produzidos para evitar perdas de nutrientes durante o processamento e estocagem. O AA é um importante componente nutricional dos sucos, e o seu conteúdo deve manter-se elevado por toda a vida de prateleira do produto. Neste estudo foi verificada a conservação de mais de 80% do AA no suco de laranja fermentado após 6 semanas de estocagem.

5.8 Avaliação da cor

As variações dos valores de luminosidade (L^*) encontrados no suco de laranja durante o armazenamento podem ser observadas na Tabela 17 e Figura 14. Num contexto geral observou-se que os valores de L^* aumentaram durante o armazenamento a 4 °C, o que tornou os sucos mais claros, ocorrendo isso provavelmente devido ao aumento da turbidez, provocado pelo aumento da biomassa de *L. casei*. Aumento semelhante foi encontrado por Raimundo et al. (2007) ao avaliarem as alterações na cor de diferentes sucos de laranja de acordo com o processamento ao qual foram submetidos.

Raimundo et al. (2007) ao avaliarem a diferença de coloração no suco de laranja ao longo do armazenamento sob refrigeração, obtiveram um $\Delta E^* < 2,0$, que foi considerado como valor limite para tornar-se perceptível à visão humana.

A ΔE^* encontrado no presente trabalho, superou esses valores logo na primeira semana ($\Delta E^*=8,16$) de armazenamento e foi aumentando até a sexta semana ($\Delta E^*=11,71$). Tal alteração pode ser atribuída ao grande número de células viáveis do *L. casei*, pois além da sua biomassa, seus produtos metabólicos podem ter alterado a coloração do produto. Uma vez que não existem estudos sobre coloração de sucos probióticos fermentados, os sucos de laranja convencionais serviram como parâmetro neste trabalho. Apesar da elevada ΔE^* , a coloração do suco de laranja fermentado não foi citada por nenhum provador como não característica do suco de laranja ou comprometedor da aceitação durante a avaliação sensorial.



Figura 13: Suco de laranja fermentado a $T=30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=6,0$ com *L. casei* B-442.

Tabela 17: Coordenadas de cor no suco de laranja fermentado ao longo do tempo de estocagem a 4°C .

Tempo (dias)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	$63,87 \pm 0,15$	$-4,78 \pm 0,07$	$28,19 \pm 0,04$	0
7	$71,28 \pm 0,25$	$-5,26 \pm 0,04$	$31,58 \pm 0,04$	8,16
14	$71,57 \pm 0,11$	$-5,43 \pm 0,03$	$31,25 \pm 0,03$	8,31
21	$72,12 \pm 0,08$	$-5,39 \pm 0,04$	$31,85 \pm 0,03$	9,05
28	$71,97 \pm 0,19$	$-5,28 \pm 0,03$	$31,88 \pm 0,03$	8,91
35	$72,11 \pm 0,07$	$-5,46 \pm 0,05$	$32,69 \pm 0,05$	9,41
42	$74,82 \pm 0,12$	$-5,62 \pm 0,05$	$32,25 \pm 0,03$	11,71

Cortes et al. (2006) ao avaliarem a cor de sucos de laranja fresco, observaram que os mesmos apresentam valores de L^* de $72,61 \pm 0,41$, ao compararem a diferença de coloração entre o suco fresco e o pasteurizado, observaram um ΔE^* de $7,32 \pm 2,86$. Esses autores comentam que para esse produto o $\Delta E^* > 2$ é percebido visualmente.

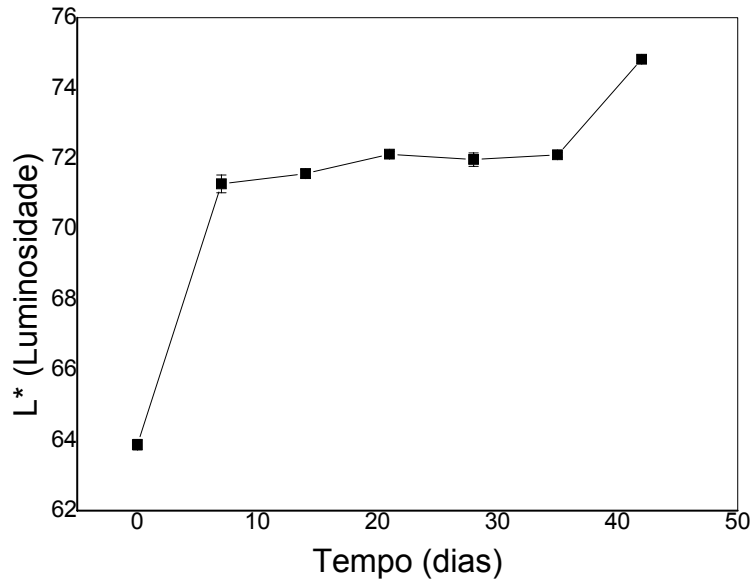


Figura 14: Variações de luminosidade (L^*) no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento.

Ocorreram variações nos valores de cor verde ($-a^*$) e amarela (b^*) durante o armazenamento que podem ser observadas nas Figuras 15 e 16, intensificando essas tonalidades no suco.

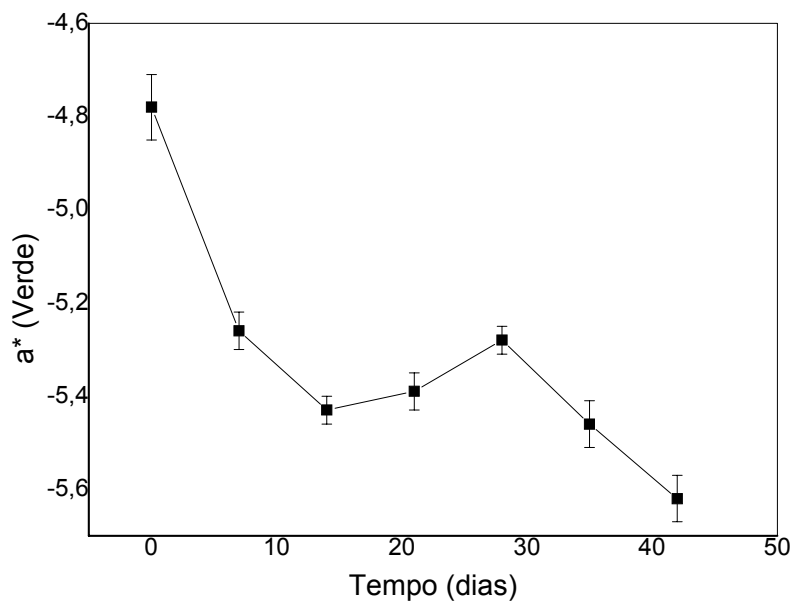


Figura 15: Variações na cor verde ($-a^*$) no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento.

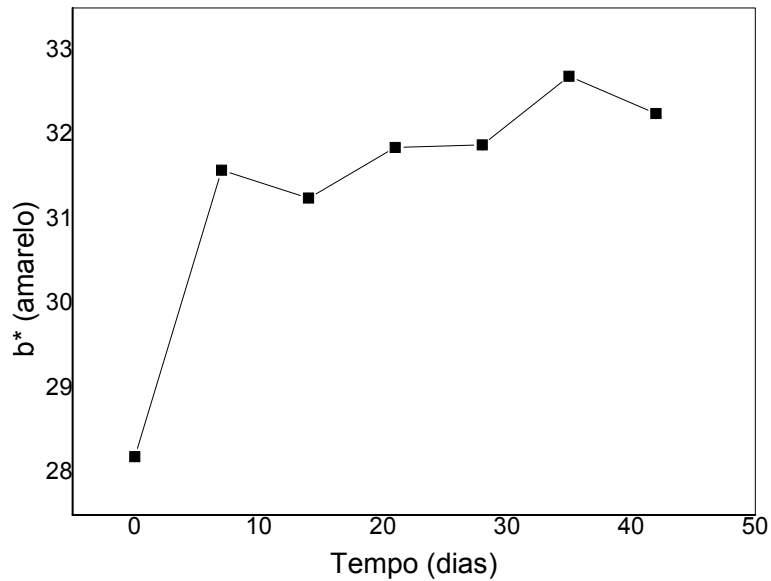


Figura 16: Variações na cor amarela (+b*) no suco de laranja fermentado ao longo de 42 dias de armazenamento.

5.9 Análise sensorial

De acordo com o teste de impressão global do suco de laranja fermentado não adoçado (Figura 17), observou-se que 65% apresentaram frequência de notas na zona de aceitação, 4% na zona de indiferença e 31% na zona de rejeição. Considerando que o suco foi elaborado a partir de um suco concentrado de laranja sem adição de açúcar, e que mais de 40% dos açúcares naturalmente existente no suco foram consumidos durante a fermentação, o sabor pouco doce do produto pode ter contribuído com o percentual de rejeição do suco.

Raimundo et al. (2007) comentam que as bactérias produtoras do ácido láctico, como os *Lactobacillus*, produzem CO₂, ácido láctico e derivados de diacetila, que induzem um forte odor e um gosto desagradável ao suco. A formação desses compostos, característicos do processo fermentativo, também podem ter contribuído para a rejeição do suco por alguns provadores.

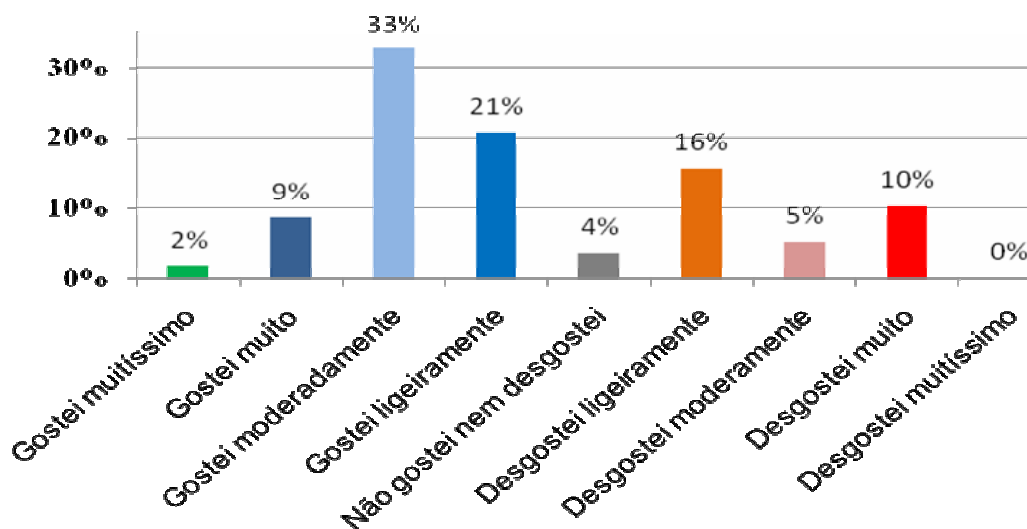


Figura 17: Distribuição dos provadores (n=57) de acordo com aceitação do suco de laranja fermentado não adoçado.

De acordo com o teste de aceitação (Figura 18) do suco de laranja fermentado adoçado com açúcar (sacarose), pode-se observar que 84% apresentaram frequência de notas na zona de aceitação, enquanto 4% situaram-se na zona de indiferença e 12% na zona de rejeição. Tais resultados mostram que o açúcar pode ser utilizado como uma estratégia para melhorar a aceitação do suco de laranja fermentado com probiótico, uma vez que a sua adição fez com que a aceitação do mesmo aumentasse de 65%, no suco não adoçado, para 84%.

Faria et al. (2006) comentam que a concentração de açúcar adicionada ao leite fermentado não influencia a viabilidade de *L. casei*, pois os açúcares naturalmente presentes no alimentos já são suficientes para o metabolismo do micro-organismo. Desta forma, a adição de sacarose tem apenas a finalidade de proporcionar características sensoriais adequadas ao paladar do consumidor brasileiro, que prefere produtos doces.

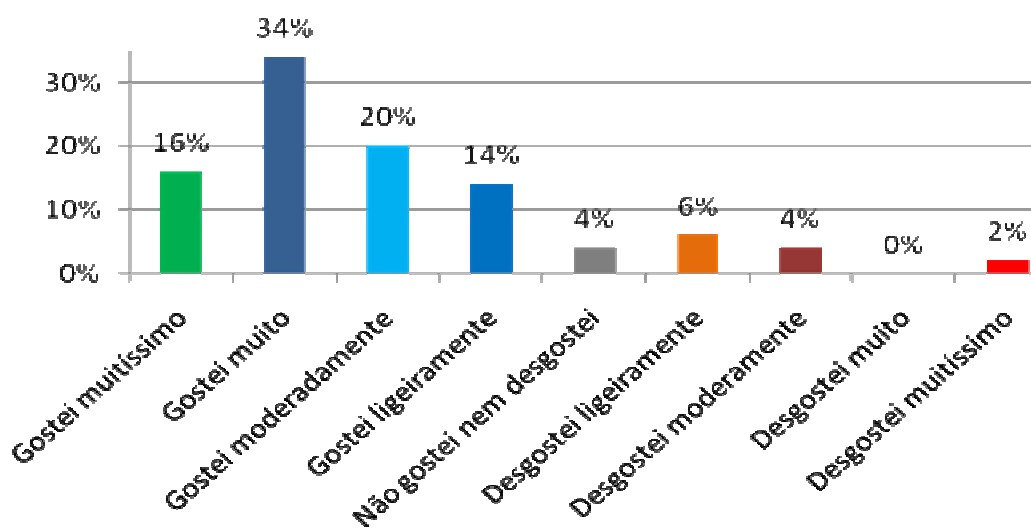


Figura 18: Distribuição dos provadores (n=50) de acordo com aceitação do suco de laranja fermentado adoçado com açúcar.

De acordo com o teste de aceitação (Figura 19) do suco de laranja fermentado adoçado com adoçante natural contendo estévia, pode-se observar que 64% apresentaram frequência de notas na zona de aceitação, enquanto 6% enquadraram-se na zona de indiferença e 30% na zona de rejeição.

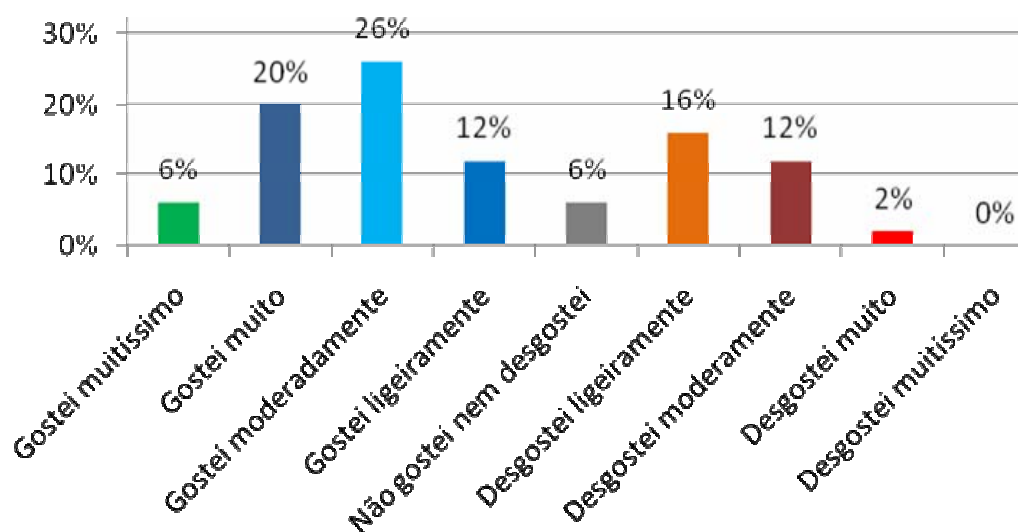


Figura 19: Distribuição dos provadores (n=50) de acordo com aceitação do suco de laranja fermentado adoçado com estévia.

Fernandes et al. (2009) e Marcellini et al. (2005) comentam que os edulcorantes ou adoçantes são produtos químicos de origem sintética ou natural, que têm a propriedade de adoçar um alimento. Dentre os edulcorantes naturais, pode-se destacar o esteviosídeo, um glicídio diterpênico extraído das folhas de *Stevia rebaudiana Bertoni*, com poder adoçante cerca de 150 a 300 vezes maior que o da sacarose e grande aplicação na indústria alimentícia devido a sua estabilidade frente ao calor e a uma ampla faixa de pH.

Para que estes edulcorantes sejam aplicados com êxito é necessário que, além de sua segurança absoluta, eles apresentem características sensoriais agradáveis, com doçura semelhante à da sacarose. A única forma de se avaliar a aceitação de um edulcorante é pela análise sensorial (BRITO et al., 2006; FERNANDES et al., 2009; MARCELLINI et al., 2005).

Fernandes et al. (2009) ao avaliarem a impressão global de sucos de goiaba adoçados com diferentes edulcorantes e com a sacarose, observaram que as bebidas adoçadas com sacarose apresentaram 78% de notas na zona de aceitação, 9% na de indiferença e 14% na de rejeição, enquanto as amostras adoçadas com estévia tiveram 13% das notas na zona de aceitação, 6% na de indiferença e 82% na de rejeição..

Marcellini et al. (2005) ao compararem a aceitação do suco de abacaxi adoçado com sacarose e com estévia em concentrações equivalentes, observaram que o suco com sacarose foi significativamente mais aceito do que o que utilizou a estévia como edulcorante.

Neste trabalho, apesar dos percentuais de notas na zona de aceitação terem sido maiores para a sacarose em relação à estévia, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as notas obtidas para esses dois sucos de acordo com teste de Tukey (Tabela 17). Os dois sucos adoçados, no entanto, tiveram notas superiores a do suco não adoçado ($p < 0,05$).

Tabela 18: Resultados da percentagem de rejeição, indiferença e aceitação e teste de Tukey de suco de laranja fermentado com e sem edulcorantes.

Edulcorante	Impressão global			Média
	% de rejeição	% de indiferença	% de aceitação	
Sem edulcorante	31	4	65	5,63 ^a
Sacarose	12	4	84	6,98 ^b
Estévia	30	6	64	6,62 ^b

*Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Apesar do teste de impressão global não ter apontado diferença estatisticamente significativa entre a aceitação do suco adoçado com açúcar e estévia, o teste de preferência realizado entre esses dois sucos (Figura 20) mostra que o primeiro foi preferido por 80% dos provadores, enquanto o segundo foi preferido por 16%. Apenas 4% dos provadores relataram não ter preferência por um ou outro suco, uma vez que não conseguiram detectar diferença entre eles.

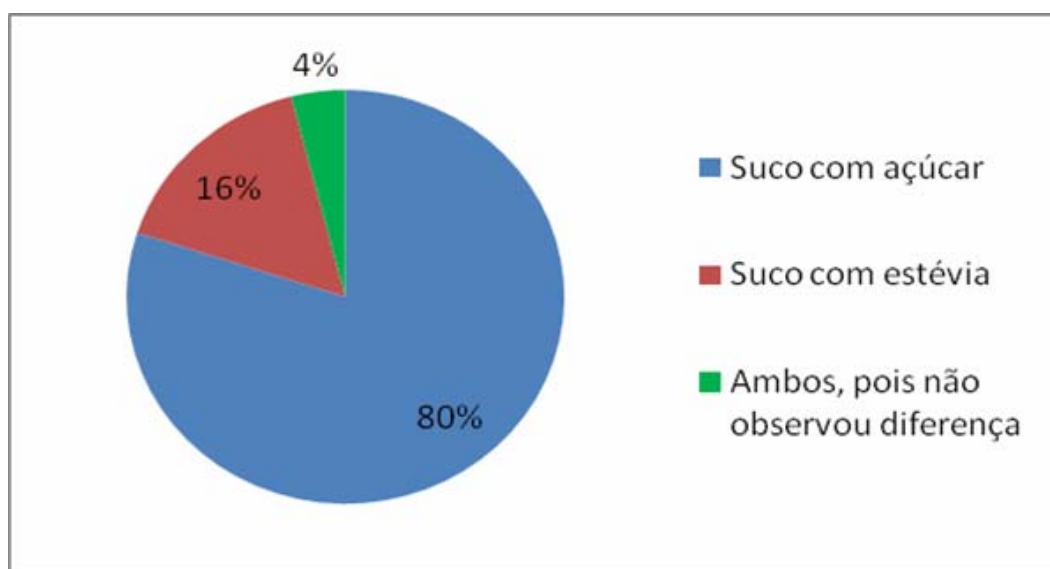


Figura 20: Distribuição dos provadores (n=50) de acordo com a preferência entre o suco adoçado com açúcar e com estévia.

Marcellini et al. (2005) comentam que a intensidade e persistência do gosto doce e a presença ou não do gosto residual são fundamentais para a aceitação e preferência dos edulcorantes por parte dos consumidores. Assim, o

sabor residual atribuído à estévia pode ter contribuído para uma maior preferência pelo suco adoçado com sacarose.

Outro fator que pode ser atribuído a uma maior rejeição do suco adoçado com estévia é o fato de ter sido utilizada a equivalência de doçura recomendada pelo fabricante, que pode não ter resultado no mesmo sabor doce para o produto em teste.

Independentemente das diferenças de impressão global observadas entre os dois sucos adoçados e o não adoçado, todos apresentaram uma frequência satisfatória de notas dentro da zona de aceitação.

6 CONCLUSÕES

O suco de laranja com o pH corrigido com NaOH mostrou-se um bom substrato para o crescimento do micro-organismo *Lactobacillus casei* NRRL B-442. Além de um elevado crescimento nesse alimento, o número de células viáveis da bactéria manteve-se acima dos níveis mínimos recomendados durante todo o armazenamento sob refrigeração.

As condições ótimas para a elaboração e fermentação do suco contendo probióticos foram: inóculo de $2 \cdot 10^7$ UFC/mL, pH do suco 6,0 e temperatura de fermentação 30°C. O tempo de fermentação ideal foi de 20 h e o tempo de armazenamento máximo foi de 42 dias, sem perda de viabilidade para a função probiótica.

A aceitação do suco foi maior para os sucos adoçados quando comparada à do suco não adoçado, mas não houve diferença significativa entre o tipo de agente edulcorante utilizado (sacarose ou estévia), mostrando que o sabor doce mascara possíveis alterações provocadas pela fermentação realizada pelas BAL. Apesar de não haver diferença significativa na aceitação entre sacarose e estévia, no teste de preferência a sacarose foi preferida pela maioria dos provadores.

Considerando-se os resultados obtidos com crescimento, viabilidade, cor e aceitação, o suco de laranja fermentado com *L. casei* tem um grande potencial para tornar-se uma alternativa saudável, saborosa e isenta de lactose no mercado de alimentos funcionais contendo probióticos, mostrando-se um substrato tão eficiente quanto os produtos lácteos para o crescimento do *L. casei*.

Mais estudos devem ser realizados a fim de estudar o potencial de outros sucos de fruta como substrato para o crescimento de micro-organismos probióticos, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALIN, A. S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p.613–621, 2004.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 24, p. 58-65, 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº33, de 25 de outubro de 2007. **Hidróxido de Sódio-INS 524**. Brasília, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry: Vitamins and other nutrients**. Washington: AOAC. Chapter 45, p. 4,1992.

ARYANA, K. J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **LWT**, v. 40, p. 1808–1814, 2007.

BELTRÁN, F.; PÉREZ-LÓPEZ, A. J.;LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; CARBONELL-BARRACHINA, A. A. Color and vitamin C content in mandarin orange juice as affected by packaging material and storage temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 27–40, 2009.

BERTAZZONI, M. E.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 723–736, 2004.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DIAZ, M. J.; PAGAN, M. J.; GARCIA, M. J.; GRAS, M. L.; MARTINEZ-MONZO, J.; FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 273–277, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 05, de 13 de novembro de 2000. **Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados**. Brasília, 2000.

BRITO, C. A. K.; CÂMARA, V. H. A.;BOLINI, H. M. A. **Equivalência de dulçor e poder edulcorante de néctares de goiaba adoçados com diferentes**

edulcorantes. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 01, n. 02, p. 26 – 36, 2006.

BURITI, F. C. A.; KOMATSU, T. R.; SAAD, S. M. I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on lactobacillus acidophilus in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p 315-317, 2007.

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M. L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y com probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n.1, p. 51-56, 2007.

CANDELA, M; PERNA, F.; CARNEVALI, P; VITALI, B.; CIATI, R.; GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; CAMPIERI, M.; BRIGIDI, P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 286–292, 2008.

CARAMIA, G.; ATZEI, A.; FANOS, V. Probiotics and the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 4–11, 2008.

CAREY, C. M.; KOSTRZYNSKA, M.; OJHA, S.; THOMPSON, S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, p 125–132, 2008.

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

CHAMPAGNE, C. P.; RAYMOND, Y.; GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus Rhamnosus* R0011 in an Apple-Based Fruit Juice under Simulated Storage Conditions at the Consumer Level. **Journal of food science**, v. 73, p. 221-226, 2008.

COELHO, A. N.; OLIVEIRA, V. R. Os benefícios dos probióticos, prebióticos e simbióticos na nutrição preventiva. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 23, n. 172/173, p.24-29, 2009.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

CORTES, C.; ESTEVE, M. J.; RODRIGO, D.; TORREGROSA, F.; FRIGOLA, A. Changes of colour and carotenoids contents during high intensity pulsed electric field treatment in orange juices. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.1932–1939, 2006.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; SOUSA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233–1239, 2009.

D'ARIENZO, R.; MAURANO, F.; LUONGO, D.; MAZZARELLA, G.; STEFANILEA, R.; TRONCONE, R.; AURICCHIO, S.; RICCAC, E.; DAVIDD, C.; ROSSI, M. Adjuvant effect of Lactobacillus casei in a mouse model of gluten sensitivity. **Immunology Letters**, v. 119, p.78–83, 2008.

DHALIWAL, M.; HIRA, C. K. Effect of storage on physico-chemical and nutritional characteristics of carrot-spinach and carrot-pineapple juices. **Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 613-617, 2004.

DE VUYST, L.; FALONY, G.; LEROY, F. Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, p. 75–78, 2008.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBAB, M.; DEIDDAB, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. 248–255, 2006.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, p. 510-521, 2008.

DROUVAULT-HOLOWACZA, S.; BIEUVELETA, S.; BURCKEL, A.; CAZAUBIEL, M.; DRAYC, X.; MARTEAU, P. A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 32, p. 147—152, 2008.

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

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. R. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesq. agropec. bras.**, v.41, n.3, p.511-516, mar. 2006.

FERNANDES, C. E.; BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 22, n. 163, p.16-21, 2008.

FERNANDES, A. G.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A.; SILVA, D. S.; SANTOS, S. M. L. Avaliação sensorial de bebidas de goiaba adoçadas com diferentes agentes adoçantes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 2, p. 358-364, 2009.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 53-61, 1999.

FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; FERNANDES, A. G. Estabilidade dos carotenóides, antocianinas e vitamina C presentes no suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) adoçado e envasado pelos processos hot-fill e asséptico. **Ciênc. agrotec.**, v. 30, n. 5, p. 942-949, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GARCIA-ALONSO, F. J.; BRAVO, S.; CASAS, J.; PEREZ-CONESA, D.; JACOB, K.; PERIAGO, M. A. J. Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 6815-6822, 2009.

GERMAN, B.; SCHIFFRIN, E. J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PFEIFER, A.; NEESER, J. The development of functional foods: lessons from the gut. **Tibtech**, v. 17, p. 492-499, 1999.

GILLILAND, S. E.; REILLY, S. S.; KIM, G. B.; KIM, H. S. Viability During Storage of Selected Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria in a Yogurt-like Product. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 3091-3095, 2002.

GIRALT, J.; REGADERA, J. P.; VERGES, R.; ROMERO, J.; FUENTE, I; BIETE, A.; VILLORIA, J.; COBO, J. M.; GUARNER, F. Effects of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 in prevention of radiation-induced diarrhea: results from multicenter, randomized, placebo-controlled nutritional trial. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 71, n. 4, p.1213–1219, 2008.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT.**, v. 40, p.1-7, 2009.

GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Food science and food biotechnology**, CRC Press LLC, 2003.

HAUKIOJA, A.; SÖDERLING, E.; TENOVUO, J. Acid Production from Sugars and Sugar Alcohols by Probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in vitro. **Caries Research**, v. 42, p. 449-453, 2008.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365-373, 2001.

INDRIO, F.; RIEZZO, G.; RAIMONDI, F.; BISCEGLIA, M.; CAVALLO, L.; FRANCAVILLA, R. The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and Gastrointestinal motility in preterm newborns. **The Journal of Pediatrics**, p 801-806, 2008.

KABASAKALIS, V.; SIOPIDOU, D.; MOSHATOU, E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. **Food Chemistry**, v. 70, p. 325-328, 2000.

KORBEKANDI, H.; JAHADI, M.; MARACY, M.; ABEDI, D.; JALALI, M. Production and evaluation of a probiotic yogurt using *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, 75-79, 2008.

KUN, S.; REZESSY-SZABO, J. M.; NGUYEN, Q. D.; HOSCHKE, A. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 816–821, 2008.

LEBLANC, A. M.; CHAVES, S.; CARMUEGA, E.; WEILL, E.; ANTÓINE, J.; PERDIGÓN, G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk

containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. **Immunobiology**, v. 213, p. 97–108, 2008.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. **Food Research International**, v. 37, p. 805–814, 2004^a.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is “healthier”? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v. 15, p. 751–759, 2004^b.

LUCKOW, T.; SHEEHAN, V.; DELAHUNTY, C.; FITZGERALD, G. Determining the aromatic and flavour characteristics of functional, health-promoting ingredients, and the effects of repeated exposure on consumer acceptance. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 53–59, 2004.

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

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2005. Capítulo 12. 1241 páginas.

MARCELLINI, P. S.; CHAINHO, T. F.; BOLINI, H. M. A. Doçura ideal e análise de aceitação de suco de abacaxi concentrado reconstituído adoçado com diferentes edulcorantes e sacarose. **Alim. Nutr.**, v. 16, n. 2, p. 177-182, 2005.

MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária UFPE, Capítulo 5, 2000.

MATTILA-SANDHOLM, T; MYLLARINEN, P; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173–182, 2002.

NANCIB, A.; NANCIB, N.; BOUDRANT, J. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p.1423–1429, 2009.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

PACHECO, M. **Tabela de equivalentes, medidas caseiras e composição química dos alimentos**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Rubio, 2006. Capítulo 11. 654 páginas.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microorganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, p. 111–123, 2008.

QIZHOU, J. W.; ZHUANG, L. Y.; QING, Z.; WEI, C.; XIAO-MING, L.; HE-PING, Z. Fermentation characteristics and transit tolerance of *Lactobacillus casei* Zhang in reconstituted mare milk during storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 249-254, 2009.

RAIMUNDO, E.; KRÜGER, R. L.; DI LUCCIO, M.; CICHOSKI, A. J. Cor, viscosidade e bactérias lácticas em suco de laranja pasteurizado e submetido ao efeito da luz durante o armazenamento. **Alim. Nutr.**, v.18, n.4, p. 449-456, 2007.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 26, p. 57-62, 2003.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **ConSCIENTIAE SAÚDE**, v. 1, p. 9-15, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, 2006.

SACCARO, D. M.; TAMIME, A. M.; PILLEGGI, A. L. O. P. S.; OLIVEIRA, M. N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, 2009.

SAHER, M.; ARVOLA, A.; LINDEMAN, M.; LAHTEENMAKI, L. Impressions of functional food consumers. **Appetite**, v. 42, p. 79–89, 2004.

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

SAXELIN, M. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 76–79, 2008.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262–1277, 2007.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p. 279–284, 2007.

SILVEIRA, M. S. **Utilização do suco e xarope de caju para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei B-442***. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SORENSEN, D; BOGUE, J. A conjoint-based approach to concept optimisation: probiotic beverages. **British Food Journal**, v. 107, n. 11, p. 870-883, 2005.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n.3, p.589-595, 2006.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, 2009.

TUORILA, H.; CARDELLO, A. V. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. **Food Quality and Preference**, v. 13, p. 561–569, 2002.

URALA, N.; LAHTEENMAKI, L. Consumers changing attitudes towards functional foods. **Food Quality and Preference**, v. 18, p. 1–12, 2007.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 16–22, 2008.

VERBEKE, W. Consumer acceptance of functional foods: Socio-demographic cognitive and attitudinal determinants **Food Quality and Preference**, v. 16, p. 45–57, 2005.

VERBEKE, W. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? **Food Quality and Preference**, v. 17, p. 126–131, 2006.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.

VLIEG, J. E. T. H.; HUGENHOLTZ, J. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1290–1297, 2007.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. Capítulo 96. 1858 páginas.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p.315-318, 2004.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v. 38, p. 73–75, 2005.

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

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 473-479, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1



Agroindústria Tropical

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa **Elaboração de bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei***. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Não haverá compensação financeira pela sua participação, ou seja, você não irá receber nenhum ressarcimento por despesas ou gratificação pela participação. O objetivo deste trabalho é realizar análise de aceitação do suco de laranja contendo micro-organismos probióticos, visando a avaliação da sua qualidade sensorial. O período de participação no projeto será de ____ a ____ de _____ de 2009. Nesse período sua presença será solicitada no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, onde, em torno de 15 minutos, você realizará o teste sensorial anteriormente descrito. Os dados serão guardados em local seguro e todas as informações obtidas serão sigilosas, sendo a divulgação dos resultados realizada de forma a não identificar os voluntários.

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Dr^a. Deborah dos Santos Garruti
Pesquisadora Responsável

.....
Consentimento da participação em Testes Sensoriais de suco de laranja fermentado

Eu, _____, portador do documento (RG ou CPF) _____, concordo em participar da análise sensorial de suco de laranja fermentado como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Fortaleza, ____/____/____ Assinatura: _____

.....
Consentimento da participação em Testes Sensoriais de suco de laranja fermentado

Eu, _____, portador do documento (RG ou CPF) _____, concordo em participar da análise sensorial de suco de laranja fermentado como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Fortaleza, ____/____/____ Assinatura: _____

ANEXO 2

NOME _____ DATA ____/____/____

SEXO: () Fem () Mas IDADE: () < 25 () 25-35 () 36-50 () >50
anos

1. Com que frequência você consome suco de laranja?

() Diariamente () Quinzenalmente () 2/3 vezes /semana

() Mensalmente () 1 vez na semana () Semestralmente

() Nunca

2. Indique o quanto você gosta de leite fermentado (Yakult).

() MUITÍSSIMO () Apenas gosto () Gosto pouco () Não gosto

3. Você está recebendo uma amostra de **suco de laranja com probióticos**. Por favor, prove a amostra indique o quanto você gostou ou desgostou, utilizando a escala abaixo:

() gostei muitíssimo

() gostei muito

() gostei moderadamente

() gostei ligeiramente

() não gostei nem desgostei

() desgostei ligeiramente

() desgostei moderadamente

() desgostei muito

() desgostei muitíssimo

4. Se você encontrasse esse produto a venda, você:

() certamente compraria

() provavelmente compraria

() talvez comprasse, talvez não comprasse

() provavelmente não compraria

() certamente não compraria

Comentários:

ANEXO 3

Nome:

Data:

Sexo: () Fem () Masc.
50 () >50

Idade: () <25 () 25-35 () 36-

1. Com que frequência você consome suco de laranja?

() Diariamente () 1 vez na semana () 2-3 vezes na semana () Quinzenalmente

() Mensalmente () Semestralmente () Nunca

2. Indique o quanto você gosta de leite fermentado (ex. Yakult)

() MUITÍSSIMO () Apenas gosto () Gosto pouco () Não gosto

3. Você está recebendo duas amostras de suco de laranja com probióticos. Por favor, prove cada

amostra e indique o quanto você gostou ou desgostou, utilizando a escala:

Amostra _____

Amostra _____

() Gostei muitíssimo

() Gostei muitíssimo

() Gostei muito

() Gostei muito

() Gostei moderadamente

() Gostei moderadamente

() Gostei ligeiramente

() Gostei ligeiramente

() Não gostei nem desgostei

() Não gostei nem desgostei

() Desgostei ligeiramente

() Desgostei ligeiramente

() Desgostei moderadamente

() Desgostei moderadamente

() Desgostei muito

() Desgostei muito

() Desgostei muitíssimo

() Desgostei muitíssimo

4. Agora que você já provou as duas amostras, indique qual o suco de sua preferência,

colocando o código da amostra no retângulo abaixo.

--

ANEXO 4 - Tabela de efeitos das variáveis independentes referentes ao crescimento e viabilidade do *L. casei* do planejamento experimental.

Efeitos estimados para o crescimento do *L. casei* após 24 h de fermentação

Crescimento		
Fator	Efeito	S.E.
Média	0,13*	0,02*
pH	0,08*	0,02*
Temperatura	0,18*	0,02*
pH x Temperatura	0,07	0,03

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança

Efeitos estimados para a viabilidade do *L. casei* após 24 h de fermentação

Viabilidade		
Fator	Efeito	S.E.
Média	8,90*	0,06*
pH	0,34*	0,07*
Temperatura	1,33*	0,07*
pH x Temperatura	-0,16	0,1

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança