



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**LIOFILIZADO PARA O PREPARO DE BEBIDA PROBIÓTICA A BASE UMBU-CAJÁ E
ACEROLA**

Dayanne Consuelo da Silva

**Recife
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**LIOFILIZADO PARA O PREPARO DE BEBIDA PROBIÓTICA A BASE UMBU-CAJÁ E
ACEROLA**

Dayanne Consuelo da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Maria Inês Sucupira Maciel

CO-ORIENTADOR: José Severino de Lira Júnior

**Recife
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**LIOFILIZADO PARA O PREPARO DE BEBIDA PROBIÓTICA A BASE UMBU-CAJÁ E
ACEROLA**

Por Dayanne Consuelo da Silva

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 18/07/2018 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Enayde de Almeida Melo.
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Profa. Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade.
Universidade Federal de Pernambuco.

Profa. Dra. Edleide Maria Freitas Pires
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela oportunidade concedida, pelos desafios postos e pela força para seguir em frente.

À minha mãe, **Fátima**, minha fiel incentivadora, por compreender e me amparar em todos os momentos e pelo exemplo de vida.

À minha orientadora, Professora **Maria Inês**, por todos os ensinamentos profissionais e de vida e pela confiança dada durante todo período que convivemos.

À Minha querida amiga, Professora **Luciana Lima**, pela imensa ajuda, compreensão e paciência.

À **Amanda Mesquita** por ser meu suporte nessa pesquisa possibilitando que tudo isso fosse possível.

Às professoras **Enayde, Samara e Edleide** por aceitarem o convite para participar da banca examinadora bem como pelas importantes contribuições para minha vida profissional.

À todos os **professores do curso** de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos por contribuírem profissionalmente com a minha formação.

À **Ana** pela presteza e dedicação com o nosso curso e a **Jaqueline** por sempre me ajudar nas atividades desenvolvidas nos Laboratórios.

Aos meus amigos, **Wilson, Flávia e Tiago**, que torceram por mim e, principalmente, a minha amiga-irmã **Renata Milanez**, pelos momentos vividos durante todo o mestrado e pelo apoio em tudo.

A todos os **participantes da pesquisa**, que me ajudaram direta ou indiretamente, pelo carinho e atenção que dedicaram a mim e ao meu trabalho.

Aos meus amigos e familiares, que me incentivaram e vibraram por mim em todo esse processo.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, pela oportunidade de estudar em uma Universidade pública de qualidade.

*“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência,
portanto, não é um feito, mas um hábito.”*

Aristóteles

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi definir a condição de secagem que propicia melhor desempenho na retenção de compostos fenólicos, ácido ascórbico e microrganismos probióticos contidos no liofilizado para o preparo de bebida probiótica a base umbu-cajá e acerola. Para tanto, o kefir foi reativado por *backslopping* e inoculado nas proporções (25% e 50%) nas polpas isoladas de acerola e umbu-cajá. A taxa de diluição de 25% de kefir para 75% de bebida mista, definida como ideal, foi utilizada nas formulações para definir a melhor formulação de bebida probiótica (9 ensaios), e avaliadas quanto a retenção de bioativos (polifenóis e ácido ascórbico) e de células viáveis de probióticos. A formulação com 90% de umbu-cajá e 10% de acerola, por ter obtido desempenho satisfatório na fermentação, foi submetida a delineamento experimental 2³ (17 ensaios) para definir as condições de secagem, tendo como variáveis independentes a temperatura do ar de secagem (-30°, -34°, -40°, -46° e -50°C), percentual de sacarose (5, 7, 10, 13 e 15) e percentual de maltodextrina 10DE (10, 12, 15, 18 e 20). O processo utilizando a temperatura de -40°C, 10% de sacarose e 15% de maltodextrina, produziu as melhores respostas, e foi caracterizado com higroscopicidade de 13,13g.100g⁻¹, densidade aparente de 0,52g.mL⁻¹, rendimento de 39,21% e solubilidade de 37,07%. Das polpas de frutas (umbu-cajá e acerola) e das bebidas mistas, probiótica e liofilizada foram obtidos extratos etanólico, por extração líquido-líquido, para determinação de polifenóis totais, taninos totais, capacidade antioxidante (inibição do DPPH*) e perfis fenólico e de ácidos orgânicos. Métodos específicos de extração foram utilizados para quantificação de carotenóides, antocianinas e flavonóis totais. A polpa de umbu-cajá apresentou elevada concentração de carotenóides e a de acerola teores expressivos de polifenóis totais. Entre as etapas de fermentação e liofilização os polifenóis, flavonóis, taninos totais, e a capacidade antioxidante apresentaram significativo aumento. Comportamento semelhante foi observado para o ácido málico e inverso para o ácido ascórbico. Por meio do perfil fenólico foi possível quantificar rutina, ácidos siríngico e vanílico e trans-reveratrol na polpa de acerola, permanecendo apenas o flavonol e os ácidos fenólicos no liofilizado. Correlações positivas foram identificadas entre a capacidade de sequestro de radical livre e flavonóis, taninos e polifenóis totais. A análise de componentes principais extraiu 100,00% da variância total e caracterizou o liofilizado pelo ácido málico, polifenóis, flavonóis e taninos totais, e percentual de inibição do DPPH*. Todos os dados foram obtidos em triplicata e submetidos aos testes t-Student, DUCAN e ANOVA, análise de variância e teste de médias, além de análises multivariadas e de correlação. Os resultados ressaltam a importância da pesquisa para o fortalecimento da cadeia produtiva das frutas, principalmente no nordeste brasileiro, onde a cultura do umbu-cajazeiro e da aceroleira tem provocado interesses econômicos.

Palavras-chave: desidratação; bebida funcional; Kefir; bioativos.

ABSTRACT

The objective of this research was to define the drying condition that provides a better performance in the retention of phenolic compounds, ascorbic acid and probiotic microorganisms contained in the lyophilisate for the preparation of a probiotic drink based on umbu-cajá and acerola. For this, kefir was reactivated by backslopping and inoculated in proportions (25% and 50%) in the isolated pulps of acerola and umbu-cajá. The 25% kefir to 75% mixed drink dilution rate, defined as ideal, was used in formulations to define the best probiotic beverage formulation (9 trials), and evaluated for bioactive retention (polyphenols and ascorbic acid) and viable probiotic cells. The formulation with 90% of umbu-cajá and 10% of acerola, for having obtained satisfactory performance in the fermentation, was submitted to an experimental design 2^3 (17 tests) to define the drying conditions, having as independent variables the drying air temperature (-30 °, -34 °, -40 °, -46 ° and -50 ° C), percentage of sucrose (5, 7, 10, 13 and 15) and percentage of maltodextrin 10DE (10,12,15,18 and 20). The process using a temperature of -40 ° C, 10% sucrose and 15% maltodextrin produced the best responses and was characterized with hygroscopicity of 13.13g.100g⁻¹, apparent density of 0.52g.mL⁻¹, yield of 39.21% and solubility of 37.07%. Liquid and liquid lyophilized extracts were obtained from liquid-liquid extraction for determination of total polyphenols, total tannins, antioxidant capacity (inhibition of DPPH *) and phenolic profiles of fruit pulps (umbu-cajá and acerola) and mixed beverages, probiotic and lyophilized and organic acids. Specific extraction methods were used to quantify carotenoids, anthocyanins and total flavonols. The pulp of umbu-cajá presented high concentration of carotenoids and that of acerola expressive contents of total polyphenols. Among the fermentation and lyophilization stages, polyphenols, flavonols, total tannins, and antioxidant capacity showed a significant increase. Similar behavior was observed for malic acid and inverse for ascorbic acid. By means of the phenolic profile it was possible to quantify rutin, mesylic and vanillic acids and trans-reveratrol in the acerola pulp, with only flavonol and phenolic acids remaining in the freeze-dried product. Positive correlations were identified between the free radical sequestration capacity and total flavonols, tannins and polyphenols. Principal components analysis extracted 100.00% of the total variance and characterized lyophilized by malic acid, polyphenols, flavonols and total tannins, and percent inhibition of DPPH *. All data were obtained in triplicate and submitted to Student's t-test, DUCAN and ANOVA, analysis of variance and test of means, as well as multivariate and correlation analyzes. The results highlight the importance of the research for the strengthening of the fruit production chain, mainly in the Brazilian northeast, where the culture of the umbu-cajazeiro and the cherry tree has provoked economic interests.

Key-words: dehydration; functional drink; Kefir; bioactive

Listas de Figuras

	pág
Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides	22
Figura 2. Estrutura química básica dos ácidos benzoico (a) e cinâmicos (b)	22
ARTIGO 1. LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS.	
Figura 1. Contribuição das variáveis (a) viabilidade microbiana (VM), percentual de retenção do ácido ascórbico (%retAA) e percentual de retenção de polifenóis totais (%retPT) e distribuição dos ensaios (b) – (C1 a C9), no sistema de coordenadas definido pela primeira e segunda componente principal.	50
Figura 2. Gráfico da cinética do crescimento microbiano do kefir e bebida de umbu-cajá e acerola probiótica	51
Figura 3. Superfícies de resposta para viabilidade microbiana ($\log\text{UFC.g}^{-1}$), relacionando: (a) sacarose x maltodextrina, (b) sacarose x temperatura de liofilização, (c) maltodextrina x temperatura de liofilização	54
Figura 4. Gráfico da comparação entre os potenciais de retenção (Ret%) dos bioativos (ácido ascórbico - AA e polifenóis totais - PT), entre os entre os ensaios 12 e Ponto Central (PC) da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica (BP) e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (L).	55
ARTIGO 2. PERFIL DOS FITOQUÍMICOS NO LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO.	
Figura 1. Contribuição das variáveis (a) - %INIB: percentual de inibição do DPPH*; TANT: taninos totais; PT: polifenóis totais; FLAVON: flavonóis totais; ANT: antocianinas; ASC: ácido succínico - e distribuição dos ensaios (b) - AC (acerola), UC (umbu-cajá), BM (bebida mista), BP (bebida probiótica) e L (liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico), no sistema de coordenadas definido pela primeira e segunda componente principal.	71
Figura 2. Contribuição das variáveis (a) - %INIB: percentual de inibição do DPPH*; TANT: taninos totais; PT: polifenóis totais; FLAVON: flavonóis totais; ANT: antocianinas; AS: ácido succínico - e distribuição dos ensaios (b) - BM (bebida mista), BP (bebida probiótica) e L (liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico), no sistema de coordenadas definido pela primeira e segunda componente principal.	72

Listas de Tabelas

	Pág
ARTIGO 1. LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS.	
Tabela 1. Formulações usadas nos tratamentos para elaboração da bebida probiótica	42
Tabela 2. Níveis codificados das variáveis independentes planejamento fatorial 2 ³ .	43
Tabela 3. Níveis decodificados das variáveis independentes planejamento fatorial 2 ³ .	43
Tabela 4. Resultados da viabilidade microbiológica, pH e sólidos solúveis das polpas isoladas de umbu-cajá e acerola em diferentes diluições.	48
Tabela 5. Parâmetros de seleção para o melhor ensaio da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica	49
Tabela 6. Variáveis independentes do planejamento fatorial para escolha da melhor condição de encapsulamento dos 17 ensaios realizados com a bebida de umbu-cajá e acerola probiótica (90:10).	52
Tabela 7. Parâmetros de determinação da cor objetiva do liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico	56
ARTIGO 2. PERFIL DOS FITOQUÍMICOS NO LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO.	
Tabela 1. Composição de fitoquímicos em polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.	67
Tabela 2. Composição de fitoquímicos da bebida mista de umbu-cajá e acerola, bebida de umbu-cajá e acerola probiótica e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico	68
Tabela 3. Resultados dos ácidos orgânicos nas polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.	69
Tabela 4. Perfil de ácidos orgânicos da bebida mista de umbu-cajá e acerola, bebida de umbu-cajá e acerola probiótica e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico	69
Tabela 5. Perfil fenólico das polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.	70
Tabela 6. Perfil fenólico em suco misto, suco misto probiótico e suco misto probiótico liofilizado.	70

Listas de abreviaturas e siglas

CENAPESQ - Laboratório Multiusuário do Centro de Apoio à Pesquisa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

GLDH - Galactono-1,4-lactona Desidrogenase

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	13
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	15
2.1. Problema de pesquisa	15
2.2. Hipótese	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. Alimentos Probióticos	16
3.2. A versatilidade e importância do Kefir	17
3.3. Frutas tropicais e uso industrial	18
3.3.1. Umbu-cajá (<i>Spondia tuberosa</i> x <i>Spondia mubin</i>)	19
3.3.2. Acerola	20
3.4. Compostos Bioativos em Frutas	21
3.4.1. Compostos Fenólicos	21
3.4.2. Ácido Ascórbico	22
3.5. Encapsulamento por Liofilização	23
3.5.1. Agentes encapsulantes e crioprotetores	25
a) <i>Maltodextrina</i>	25
b) <i>Sacarose</i>	25
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. ARTIGO 1. LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS.	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
5.2. Artigo 2 - PERFIL DOS FITOQUÍMICOS NO LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO.	61
RESUMO	61
ABSTRACT	62
INTRODUÇÃO	63
MATERIAL E MÉTODOS	63

RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos com caráter funcional tem crescido devido à exigência e melhor informação dos consumidores quanto à necessidade de não somente nutrir, mas buscar alimentos que tragam benefícios a sua saúde. Estes alimentos interagem no organismo juntamente com a microbiota intestinal, beneficiando sua funcionalidade (MARTINS et al, 2013; CORONA et al, 2016). Entretanto, apesar da crescente demanda por novos produtos, a inclusão de probióticos em matrizes alimentícias ainda é uma área desafiadora para pesquisas em tecnologia de alimentos (MARTÍN et al, 2015).

O grande número de produtos probióticos disponíveis no mercado compreende principalmente produtos lácteos. No entanto, uma grande parte da população mundial é afetada pela intolerância à lactose além de alergia à proteína do leite, galactosemia e hipercolesterolemia, impossibilitando o consumo de produtos de origem láctea (ALVES et al, 2016; PERRICONE et al, 2015). Este cenário demonstra cada vez mais a importância do desenvolvimento de produtos probióticos usando fontes não lácteas (ANTUNES et al, 2013). Nas últimas décadas, o interesse científico por bebidas fermentadas não lácteas vem destacando a utilização do kefir de água (CORONA et al, 2016). Este produto é formado a partir da atividade fermentativa de uma cultura natural, fruto de simbiose complexa entre uma grande variedade de bactérias ácido lácticas e leveduras em uma matriz de polissacarídeo de grânulos semi-rígidos de coloração esbranquiçada ou caramelo (SATIR e GUZEL-SEYDIM, 2016). Uma característica que o difere de outros probióticos é o poder de recuperação após a fermentação com um ligeiro aumento da biomassa dos grãos (SATIR e GUZEL-SEYDIM, 2015).

Concomitantemente, os sucos de frutas são amplamente consumidos em todo o mundo por diferentes faixas etárias e sua ingestão aumentou rapidamente nas duas últimas décadas devido à presença de fitoquímicos funcionais e bioativos que oferecem excelentes atributos sensoriais além de benefícios à saúde (SZYMCZYCHA-MADEJA et al, 2014). Os sucos ou a mistura de dois ou mais sucos de frutas podem resultar em novos produtos com diversas vantagens devido à combinação de propriedades sensoriais e nutricionais (OLUDEMI et al, 2013).

Apesar do crescente consumo, os sucos de fruta apresentam uma quantidade elevada de água, o que aumenta o seu custo de transporte e necessidade de armazenamento sob refrigeração para os não estéreis. Desta forma, técnicas de conservação são necessárias para garantir a integridade microbiológica, físico-química e sensorial desse produto. Uma das técnicas de conservação mais eficiente utilizada atualmente é a encapsulação de ingredientes que pode ser definida como: a inclusão de pequenas partículas sólidas, gotículas líquidas ou gases em um material de revestimento

que permite a formação de uma barreira física entre o meio externo e os materiais sensíveis do núcleo, protegendo compostos de interesse da degradação pela umidade, pH e oxidação (DRUSCH et al, 2012; NESTERENKO et al, 2013).

Em virtude disso, diversas técnicas de encapsulamento estão disponíveis para uso industrial sendo a liofilização considerada como a mais eficiente na conservação de nutrientes de produtos em pó, devido às faixas de temperaturas de processo (SHISHIR e CHEN, 2017). Além disso, em sucos probióticos deve-se preservar a carga de células vivas, ou seja, a viabilidade microbiana, parâmetros determinante na definição das variáveis do processo (ALVES et al, 2016).

A elaboração de suco de fruta com alegação funcional abre um novo leque de oportunidades para os consumidores, visto que a maioria dos alimentos funcionais existentes no mercado é obtido de derivados lácteos (ALVES et al., 2016; CORONA, et al., 2016; PERRICONE et al, 2015; ANTUNES et al, 2013; MARTINS et al, 2013). Ademais, os pós obtidos de sucos de frutas representam um mercado promissor, uma vez que esta forma física proporciona um produto estável, natural e facilmente reconstituível, o qual pode ser usado como corante e/ou flavorizante em produtos alimentícios, agregando valor nutricional ao produto final (BETORET et al, 2011). Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi definir a condição de secagem que propicia melhor desempenho na retenção de compostos fenólicos, ácido ascórbico e microrganismos probióticos contidos no liofilizado para o preparo de bebida probiótica a base umbu-cajá e acerola.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

2.1. Problema de pesquisa

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios com alegação funcional torna-se cada vez mais desafiador uma vez que, deve suprir a expectativa do consumidor quanto ao sabor e funcionalidade.

A indústria de alimentos observa muitas variáveis para desenvolver ou reestruturar produtos de caráter funcional, tais como a aceitação sensorial, preço, estabilidade química, propriedades funcionais e conveniência técnica. Na categoria de alimentos com alegação funcional, o segmento de bebidas probióticas tem se destacado devido ao interesse do consumidor nos benefícios para saúde intestinal, fortalecimento da imunidade e melhora da digestão.

Por outro lado, é crescente a procura por produtos que contenham substâncias antioxidantes capazes de diminuir ou prevenir a oxidação molecular, associada a diversas patologias como doenças cardiovasculares, cânceres e processos degenerativos. Nesse contexto, como potencializar o caráter funcional do liofilizado para o preparo de bebida probiótica a base umbu-cajá e acerola?

2.2. Hipótese

Ao utilizar diferentes faixas de temperatura de secagem e distintas proporções de agentes crioprotetores no processo de liofilização, será obtida a melhor condição de processamento que potencializará o caráter funcional do liofilizado para o preparo de bebida probiótica a base umbu-cajá e acerola.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de bebidas com caráter funcional possui forte correlação com a redução de doenças crônico-degenerativas, principalmente aquelas relacionadas à saúde intestinal além de diversos tipos de cânceres. A presente pesquisa busca o incentivo a adoção de hábitos saudáveis e a inclusão de probióticos em pó na dieta alimentar melhorando a saúde da população como um todo.

3.1. Alimentos Probióticos

O interesse dos consumidores em alimentos que conferem benefícios à saúde levou, nas últimas décadas, ao desenvolvimento de novos produtos alimentares atrelados a conveniência de consumo, sabor e funcionalidade em prol da saúde humana, levando ao crescimento do mercado de produtos probióticos (IÇIER et al, 2015). Esses produtos representam quase 43% do mercado mundial de produtos lácteos sendo, em sua maioria, constituídos por produtos lácteos fermentados (STALIANO et al, 2015).

Os alimentos funcionais influenciam positivamente um ou mais fatores biológicos, melhorando a saúde, a sensação de bem-estar reduzindo o risco de doenças degenerativas não transmissíveis. Dentro desta categoria de alimentos, estão incluídos os produtos que contêm microrganismos probióticos (HUSSAIN et al, 2016; STALIANO et al, 2015) que, segundo FAO/OMS (2002) são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro".

As espécies microbianas mais utilizadas em alimentos funcionais pertencem aos gêneros de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Pesquisas foram desenvolvidas para a determinação da origem das cepas, tolerância às condições hostis do estômago e intestino delgado e capacidade de aderir às superfícies do intestino (BUSTAMANTE et al, 2015). No entanto, o critério final para selecionar uma estirpe probiótica bem-sucedida é a capacidade de conferir aos consumidores benefícios à saúde humana (GREPPI et al, 2017).

Neste contexto, a capacidade de adesão das células probióticas ao epitélio intestinal permite que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos por mais tempo por meio de moléculas localizadas nas superfícies bacterianas servindo como conectores que podem interagir, especificamente, com receptores hospedeiros no tecido intestinal e induzir vias de sinalização resultando em efeitos probióticos (UROIC et al, 2016).

Na prática, os probióticos desempenham um papel importante, por exemplo, na manutenção da microbiota intestinal natural, proteção contra patógenos gastrointestinais, metabolismo da lactose, diarreia infantil, além de benefícios extra intestinais, tais como,

redução do nível de colesterol e pressão sanguínea, prevenção de alguns tipos de câncer e redução da incidência de doenças urogenitais e respiratórias (GIL-RODRÍGUEZ et al, 2015).

O número de microrganismos viáveis no momento do consumo é extremamente importante para fornecer os benefícios esperados para a saúde. Conseqüentemente, a sobrevivência probiótica durante o processamento e o armazenamento de produtos probióticos deve ser monitorada. Embora o número ideal de microrganismos probióticos viáveis não tenha sido estabelecido, níveis entre 10^6 a 10^9 UFC.g⁻¹ são mundialmente aceitos (ABADIA-GARCÍA et al, 2013). Além da sobrevivência probiótica no produto final, as características sensoriais são importantes para aceitação e consumo desses alimentos (SILVA et al, 2015).

Sucos de frutas e produtos à base de chocolate são alimentos probióticos atrativos, mas pouco disponíveis no mercado. Estes produtos têm como objetivo alcançar grupos populacionais que, geralmente, não têm acesso a uma alimentação saudável por diversas razões. Além disso, alimentos probióticos não lácteos, como os sucos de frutas fermentados, isentos de lactose e de soja, podem proporcionar manutenção da saúde em consumidores preocupados com a ingestão de determinadas substâncias ou portadores de alguma intolerância alimentar (GAWKOWSKY e CHIKINDAS, 2013).

3.2. A versatilidade e importância do Kefir

O Kefir é uma bebida tradicionalmente russa, de baixo teor alcoólico, que utiliza o leite como substrato inicial para ação fermentativa dos seus grãos, uma cultura de iniciação natural, que contém uma mistura simbiótica microbiana complexa composta por bactérias lácticas (por exemplo, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, dentre outros) e leveduras (Por exemplo, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*) em uma matriz de polissacarídeos de grânulos semi-duros (NIKOLAOU et al, 2017; GAROFALO et al, 2015).

Essa bebida probiótica foi de grande importância popular durante o século XX, devido a pesquisas que investigaram sua contribuição para a saúde, passando os fermentados a serem usados no tratamento de tuberculose, câncer e distúrbios gastrointestinais (BERGILLOS-MECA et al, 2015).

Os grãos de Kefir podem ser usados também para fermentar diferentes substratos além do leite. Estes incluem soro de queijo, melaço ou xaropes de açúcar bem como resíduos agroindustriais, como iniciador do processo fermentativo na produção de queijo e recentemente para fermentação de vários vegetais e sucos de frutas (NIKOLAOU et al, 2017; CORONA et al, 2016; RANDAZZO et al, 2016; SATIR, 2016; CUI et al, 2013; PUERARI et al, 2012).

O kefir não lácteo, em água, é preparado com uma solução de sacarose com ou sem extratos de frutas a serem fermentados pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir. Essa bebida apresenta coloração amarelada e está composta de dióxido de carbono, etanol, ácido acético, ácido láctico e vários compostos resultantes do processo fermentativo incluindo compostos aromáticos voláteis, a depender da composição e das interações microbiológicas do kefir (FELS et al, 2018; CORONA et al, 2016; LAUREYS e DE VUYST, 2014).

Sucos de frutas contêm água, açúcar, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais, sendo um meio adequado e rico para crescimento microbiano podendo ser usados para preparar bebidas fermentadas, como vinho e outros produtos (ALVES et al, 2016). Além disso, a fermentação desses substratos confere as bebidas gosto ácido, refrescância, ligeira carbonatação e baixo teor alcoólico e de ácido acético (CORONA et al, 2016).

Como o consumo de vegetais é fortemente aconselhado por muitos governos para reduzir o risco de várias doenças, sua fermentação pode ampliar a escolha e promover o consumo desses produtos. Ao longo dos anos, novos e diversos métodos para processamento de frutas surgiram como forma de minimizar perdas de produção, aumentar a renda de pequenos agricultores e introduzir novos produtos no mercado (RANDAZZO et al, 2016).

O desenvolvimento de bebidas fermentadas à base de suco de frutas com kefir pode ser percebido pelos consumidores como uma alternativa saudável devido aos numerosos efeitos positivos do kefir, bem como dos vegetais à saúde humana, (PUERARI et al, 2012). Além disso, substratos alternativos utilizados na produção de bebidas fermentadas com kefir possui uma forma ideal de conversão dos açúcares em ácidos orgânicos e álcool, baseado na biotecnologia, para manutenção e/ou melhoria da segurança alimentar, nutricional e sensorial das bebidas fermentadas (FIORDA et al, 2016).

3.3. Frutas tropicais e uso industrial

O consumo de frutas não é apenas resultado do gosto e preferências pessoais, mas também depende da preocupação com a saúde, valor nutricional e acesso à informações sobre os benefícios dos compostos bioativos contidos nestes vegetais (SILVA et al, 2014; SOUZA et al, 2012). Além dos nutrientes essenciais, a maioria das frutas apresenta quantidades consideráveis de micronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e compostos fitoquímicos secundários com comprovada importância desses micronutrientes para a saúde humana (RUFINO et al, 2010; SILVA et al, 2014).

O Brasil possui uma grande quantidade de espécies de frutas exóticas e nativas, subexploradas por meio do extrativismo vegetal e em pequenas áreas de produção, porém

despertam o interesse da agroindústria, podendo ser fonte de renda para grupos populacionais vulneráveis habitantes na região de cultivo. Ademais, o consumo de frutas tropicais e nativas está aumentando nos mercados domésticos e internacionais devido ao crescente reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico (SILVA et al, 2014).

A região nordeste do Brasil é conhecida pela fruticultura em grande escala com cultivo de espécies tropicais e subtropicais. Esta região apresenta condições climáticas favoráveis, tais como temperaturas elevadas, incidência solar intensa e baixa umidade, além de ter regiões favorecidas por mananciais de água que propiciam a irrigação. Ademais, a região tem espécies de frutos exóticos, com destaque ao gênero *Spondias*, muito apreciados, tais como o cajá (*Spondias mombin* L.), umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) e o umbu-cajá (*Spondia tuberosa* x *Spondia mombin*), cujo consumo ainda depende do extrativismo vegetal (SOUZA et al, 2012).

Sendo importante ressaltar que na composição destes frutos estão presentes compostos bioativos que garantem a atividade antioxidante, associada positivamente à proteção contra o estresse oxidativo no organismo, uma das causas mais importantes de doenças crônicas degenerativas não transmissíveis (ALMEIDA et al, 2011).

3.3.1. Umbu-cajá (*Spondia tuberosa* x *Spondia mombin*)

Embora a origem do fruto seja desconhecida, o umbu-cajá (*Spondias* sp) é considerado um híbrido interespecífico da 'cajazeira' (*Spondias mombin* L.) com 'umbuzeiro' (*Spondias tuberosa* Arruda), típico da região semiárida do Nordeste brasileiro derivando em uma espécie nativa. Esta espécie é tolerante à escassez hídrica, atinge 6 a 8 m de altura e até 20 m de diâmetro de copa, tendo arquitetura de planta muito semelhante ao umbuzeiro, porém com maior porte (NARAIN, GALVÃO e MADRUGA, 2007; CARVALHO et al, 2008, LIRA JÚNIOR et al, 2005).

O fruto da umbu-cajazeira é caracterizado como uma drupa arredondada, de cor amarela, casca fina e lisa, com endocarpo grande, branco, suberoso e enrugado, localizado na parte central do fruto, no interior do qual se encontram os lóculos, que podem ou não conter uma semente. A umbu-cajazeira apresenta cerca de 90% dos endocarpos desprovidos de sementes o que torna inviável a sua propagação sexual, sendo tradicionalmente propagada pelo método vegetativo assexuado, estaquia (SILVA et al, 2015).

Apesar da grande importância econômica na produção de sucos processados, o umbu-cajá é uma espécie subutilizada de alto potencial para o agronegócio, possuindo alguns exemplares xerofíticos em alguns estados do Nordeste do Brasil, tais como Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí, Pernambuco e Bahia (RUFINO et al, 2010).

A produção de umbu-cajá, embora não quantificada no Brasil, é considerada de menor escala. Os frutos aumentaram a participação no agronegócio da região Nordeste, principalmente no comércio, através de processamento de frutas com grande aceitação no mercado devido ao seu sabor, aroma de excelente qualidade e boas características agroindustriais, com o rendimento da polpa acima de 60 % e sólidos solúveis de cerca de 10°Brix, sendo usado como matéria-prima em sucos, picolé, sorvete e néctares (SOUZA et al, 2012).

Entretanto, apesar do umbu-cajá ter alto potencial no Nordeste, onde há predominância, há poucas plantações comerciais. As frutas são principalmente consumidas na região de plantio e o excedente é vendido para outras regiões do país em forma de polpa (NARAIN, GALVÃO e MADRUGA, 2007).

Vários fatores influenciam as características físicas e físico-químicas das frutas, entre os quais se destacam a constituição genética, condições edafoclimática, cultivo e tratamento pós-colheita (RODRIGUES et al, 2012). Apesar de ser um produto de extrativismo, para aproveitar todo o potencial de comercialização de frutos de umbu-cajá é importante conhecer o ciclo vegetativo da planta e condições de maturação, como mudanças de coloração, textura e sabor, além das variações de compostos voláteis. O alto potencial antioxidante do umbu-cajá está associado à concentração de compostos fenólicos, principalmente taninos (ZERAİK et al, 2016; OMENA et al, 2012).

A disponibilidade sazonal das frutas de umbu-cajá e sua curta vida útil limitam o potencial de comercialização. Técnicas de conservação, tais como extração e congelamento de polpas é uma alternativa ao consumo de frutas frescas (PAZ et al, 2015; SILVA et al, 2014).

3.3.2. Acerola

Acerola (*Malpighia emarginata* DC) é uma fruta nativa das Américas com maiores plantações localizadas no Brasil (MALEGORI et al, 2017). O sabor agradável e altos níveis de compostos antioxidantes, como ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos incluindo antocianinas e flavonóides, levaram a um aumento do seu consumo como fruta fresca ou em produtos industrializados, tais como polpas, sucos, geleias, cremes, xaropes e licores (BELWAL et al., 2018; SILVA, DUARTE e BARROZO, 2016).

Além de seus benefícios nutricionais a acerola tem polpa succulenta e refrescante, sabor característico e gosto ácido, atributos sensoriais adequados para elaboração de sucos e bebidas fermentadas (CAPPATO et al, 2018).

Entretanto, a acerola é uma fruta climatérica e altamente perecível, necessitando rápida e ágil comercialização e processamento. Neste último, as etapas de processos

térmicos envolvendo transferência de calor (aquecimento, resfriamento e congelamento) necessitam de dimensionamento e condições que potencializem a preservação dos nutrientes e características sensoriais (PEREIRA, RESENDE e GIAROLA, 2014).

3.4. Compostos Bioativos em Frutas

Compostos bioativos estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos e são considerados como ingredientes não nutritivos, mas vitais para a manutenção da saúde humana (BARROS et al, 2017). Nas frutas podem ser encontradas diversas classes de bioativo, dentre as quais podemos destacar os fenólicos e carotenoides.

3.4.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, amplo e complexo grupo de substâncias, englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, está presente na alimentação em uma variedade de vegetais e de produtos industrializados.

A ação antioxidante dos polifenóis está diretamente relacionada à sua molécula e o interesse nesses fitoterápicos tem aumentado desde que foram associados à redução no índice de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), a exemplo das doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurológicas e diabetes (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). Ademais, atribui-se esses outros efeitos benéficos à saúde, devido à sua ação antioxidante sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), indução do relaxamento vascular e redução da agregação plaquetária (FALCÃO et al, 2007).

A atividade antioxidante é atribuída aos íons de hidrogênio (H^+) dos grupos hidroxila, localizados em várias posições dos anéis, às duplas ligações dos anéis benzênicos e à dupla ligação da função oxo ($-C=O$) de algumas moléculas, cuja atividade biológica depende da biodisponibilidade, absorção e metabolização que, por sua vez, estão relacionadas à estrutura química, grau de polimerização e solubilidade desses compostos (GONZAGA et al, 2008; MIRA et al, 2008; KOSIR et al, 2004).

De acordo com a literatura, os compostos fenólicos estão divididos em: flavonoides (isoflavonóides, antocianidinas, flavanóis, flavonóis, flavanonas e flavonas) e não flavonoides (ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico, estilbenoides, lignóides e cumarinas). Os flavonóides são caracterizados pela estrutura base constituída por dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (Figura 1) e podem ser encontrados no estado livre ou associados com outros flavonoides, açúcares, não flavonoides, ou ainda combinações destas moléculas. Os não flavonoides (Figura 2) incluem os estilbenos e derivados de ácidos benzoico e cinâmico (KADERIDES e GOULA, 2017; BATAGLION et al, 2015).

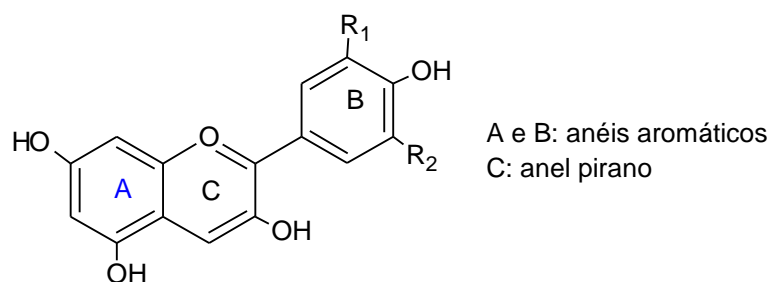


Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides.

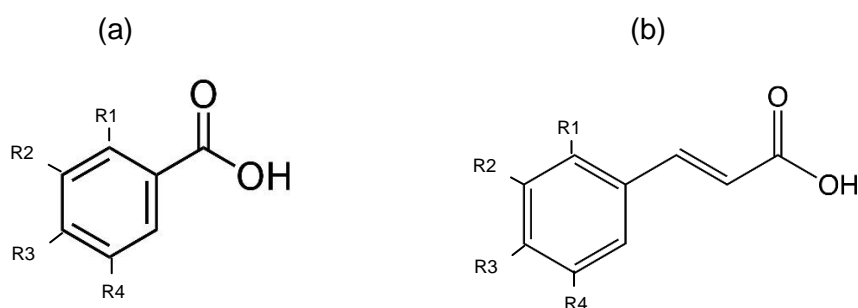


Figura 2. Estrutura química básica dos ácidos benzoico (a) e cinâmicos (b).

Nas espécies frutíferas nativas e exóticas de países tropicais, os compostos fenólicos estão presentes em grandes quantidades, aumentando assim o interesse da indústria de alimentos por estas frutas e seus subprodutos (SOUZA et al, 2012).

3.4.2 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais importantes em plantas por proteger as células do estresse oxidativo interagindo enzimaticamente e não enzimaticamente com espécies reativas de oxigênio. Além disso, é co-fator chave para várias enzimas participando da regulação da fotossíntese, biossíntese de hormônio e senescência das plantas (ZHANG et al, 2015).

O ácido ascórbico atua como co-fator em diversos processos fisiológicos (hidroxilação de prolina e lisina na síntese de colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo, síntese de norepinefrina e hormônios adrenais, a ativação de hormônios peptídicos e a síntese de carnitina) e como antioxidante reduzindo o risco de arteriosclerose, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (FELIPE et al, 2013; DU et al, 2012).

Apesar de sua importância, devido a uma mutação na enzima biossintética GLDH, os seres humanos não conseguem sintetizar o ácido ascórbico e devem obtê-lo por meio da dieta diária pela ingestão, principalmente, de frutas cítricas e vegetais folhosos (ZHANG et

al, 2015). Nos últimos anos, para atender aos requisitos de saúde e à crescente demanda dos consumidores por alimentos altamente nutricionais, o metabolismo do ácido ascórbico nas plantas foi amplamente investigado e vários esforços foram feitos para melhorar seus níveis em frutas e hortaliças (MA et al, 2012; MA et al, 2014, GALLIE, 2013).

3.5. Encapsulamento por Liofilização

Uma característica dos componentes alimentares bioativos é a suscetibilidade a rápida inativação ou degradação. Em virtude disso, os métodos de encapsulamento surgiram como processos que retardam as degradações e/ou evitam a degradação até que o produto seja consumido. Esses componentes bioativos incluem lipídios, vitaminas, peptídeos, ácidos graxos, antioxidantes, minerais e também células vivas, como os probióticos (VOS et al, 2010).

A liofilização é a técnica mais adequada para a desidratação de materiais encapsulados sensíveis ao calor (RAY, RAYCHAUDHURI e CHAKRABORTY, 2016; ATALAR e DERVISOGLU, 2015; VOS et al, 2010), por proporcionar estabilidade ao produto por meio das operações principais, congelamento, sublimação e dessecção (RAY;RAYCHAUDHURI e CHAKRABORTY, 2016). Este processo realiza adsorção a longo prazo cuja preservação de alimentos sensíveis ao calor e outros materiais biológicos está fundamentada no fenômeno de sublimação preservando a maioria das propriedades iniciais da matéria-prima, tais como forma, dimensões, aparência, sabor, cor, textura e atividade biológica (ATALAR e DERVISOGLU, 2015).

Entretanto, a eficiência da proteção ou da liberação controlada depende, principalmente, da composição e estrutura do material de parede (agente encapsulante). Os materiais de parede mais usados são goma arábica, maltodextrina, amidos emulsificantes e proteína de soro de leite. (RAY, RAYCHAUDHURI e CHAKRABORTY, 2016; CEBALLOS e GIRALDO, 2012). Estas micropartículas podem fazer parte dos ingredientes utilizados para fabricação de produtos alimentícios ou serem formadas durante o processamento. A principal finalidade da microencapsulação é o aprisionamento de componentes de interesse, tais como aromas, lipídios, corantes, agentes antioxidantes, microrganismos, ingredientes ativos de frutos e cereais entre outros compostos bioativos (JOYE e MCCLEMENTS, 2014; SILVA et al, 2013).

Diferentes substâncias de peso molecular elevado como maltodextrina e goma arábica têm sido relatadas como boas alternativas para serem utilizadas como agentes de carreadores em sucos de fruta (FAZAELI et al,2012; PHISUT, 2012). Estas substâncias agem aumentando a transição vítrea e reduzindo a aderência e incrustações, produzindo um

fluido em pó livre e com melhor propriedade e comportamento físico-químico (KRISHNAIAH et al, 2014).

O encapsulamento é investigado como um meio de fornecer proteção aos microrganismos quando estes são introduzidos no trato intestinal (CORONA-HERNANDEZ et al, 2013; FEUCHT e KWAK, 2013). Para aplicações alimentares, o encapsulamento de probióticos é bastante utilizado devido à simplicidade, não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo dos agentes encapsulantes (WANG et al, 2015). Os estudos sobre os efeitos do encapsulamento na proteção de bactérias nas condições gastrointestinais mostraram vantagens do encapsulado probiótico em comparação com células livres sob condições gástricas *in vitro* (HUQ et al, 2013).

Ademais, a microencapsulação pode oferecer vantagens para melhorar a manipulação de culturas probióticas, bem como para o mascaramento do sabor e aroma resultante da produção de diferentes compostos metabólicos produzidos na fermentação de alimentos (YONEKURA et al, 2014).

A seleção de materiais encapsulantes e adoção de tecnologias otimizadas na fabricação de microcápsulas probióticas é de extrema importância e reflete, estritamente, a preservação de propriedades morfológicas e funcionais das cápsulas. Os agentes encapsulantes desempenham um papel primordial na determinação do tamanho, morfologia, textura, porosidade e outras propriedades relevantes das cápsulas que influenciam o sucesso da proteção dos probióticos (PRISCO et al, 2015).

Neste contexto, os biopolímeros de qualidade alimentar são as matrizes mais investigadas e usadas para encapsulamento celular devido à sua eficácia na proteção de probióticos em várias condições de estresse, como por exemplo, pH gástrico, sais biliares, enzimas, trabalhando como barreiras físicas reais. Além disso, a disponibilidade, baixo custo e a biocompatibilidade também são requisitos relevantes (BOSNEA et al, 2014).

O pó seco apresenta potencial econômico relevante em relação aos equivalentes líquidos. O suco de fruta em pó pode facilmente ser manipulado e transportado devido a sua redução de peso e volume, bem como tamanho reduzido da embalagem somando-se a isto o aumento da vida de prateleira (ISLAM et al, 2016).

Para maximizar esses efeitos, estudos mostram que a composição e concentração dos sólidos na solução encapsulante pode melhorar a viabilidade dos probióticos (FRITZEN-FREIRE et al, 2013). Além disso, a sobrevivência e viabilidade são explicadas devido o encapsulamento celular em uma matriz sólida oferecer proteção não só durante a secagem, mas também durante o armazenamento (OBEROI e SOGI, 2015).

3.5.1. Agentes encapsulantes e crioprotetores

a) *Maltodextrina*

As maltodextrinas resultam da degradação enzimática de ligações glicosídicas do amido e são caracterizadas por um equivalente de dextrose (DE) inferior a 20, contendo polímeros de (1,4) D-glicose (YUSRINI, HARIYADI e KUSNANDAR, 2013).

O equivalente de dextrose é um parâmetro principal que apresenta propriedades reológicas e funcionais das maltodextrinas. No entanto, as maltodextrinas com mesmo valor DE podem apresentar propriedades físico-químicas diferentes, devido à possibilidade de serem produzidas a partir de amidos de diferentes origens botânicas e, portanto, com diferentes estruturas, amilose e amilopectina (PYCIA, JUSZCZAK e GAŁKOWSKA, 2015).

A maltodextrina melhora a qualidade dos produtos desidratados, diminuindo a viscosidade e aumentando a estabilidade do produto (NURHADI, ROOS e MAIDANNYK, 2016). Estas ações têm sido atribuídas à capacidade da maltodextrina de absorver água formando uma barreira protetora de umidade na superfície higroscópica das partículas e pela capacidade de aumentar a temperatura de transição vítrea (VALENZUELA e AGUILERA, 2015; YUSRINI, HARIYADI e KUSNANDAR, 2013).

Por proporcionar boa proteção contra a oxidação as maltodextrinas têm sido utilizadas em produtos onde ganhos significantes de umidade são indesejáveis (BULE, SINGHAL e KENNEDY, 2010).

b) *Sacarose*

As etapas que compõem o processo encapsulamento de microrganismos por liofilização muitas vezes levam a danos e injúrias celulares além de alterações na permeabilidade da membrana celular, levando ao aumento da sensibilidade à alguns agentes seletivos, aumento da fase de adaptação do microrganismos e necessidade de incremento nutricional (HUBÁLEK, 2003).

O emprego de agentes crioprotetores no armazenamento de microrganismos congelados surgiu como uma ação para minimizar os danos celulares. Estes agentes incluem diversos compostos químicos (simples ou complexos), incluindo alguns açúcares que são capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelamento. Os agentes permitem estabilização da bicamada lipídica, promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática. Assim, alguns açúcares como a sacarose e a trealose estabilizam a bicamada de fosfolipídios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de

membranas e manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água (AGUIAR et al, 2012).

O efeito crioprotetor da sacarose tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de microrganismos em concentrações de 1 a 68%p/p. Sendo importante destacar que a escolha destas substâncias é influenciada pelo microrganismo alvo da liofilização, porém compostos como o leite desnatado, soro, trealose, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose e alguns polímeros como dextrana e polietilenoglicol podem oferecer proteção para muitas espécies (HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005).

Diante do exposto, o desenvolvimento do liofilizado para o preparo de bebida probiótica a base umbu-cajá e acerola surge como alternativa para os consumidores com alergias ao leite ou soja além de ser fonte de compostos bioativos relevantes para a prevenção de doenças como também fortalecer a preservação de frutas típicas do Nordeste brasileiro.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABADÍA-GARCÍA, L., CARDADOR, A., CAMPO, S., ARVÍZU, S., CASTAÑO-TOSTADO, E., REGALADO-GONZÁLEZ, C. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v.33, p.191-197, 2013.

AGUIAR, T.D.F., TEIXEIRA, M.F.S., TELES, C.H.A., MARTINS, G.R., BEZERRA JÚNIOR, R.Q., COSTA, E.C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de microorganismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, p.80-93, 2012.

ALMEIDA, M.M.B., SOUSA, P.H.M.S., ARRIAGA, A.M.C., PRADO, G.M.P., MAGALHÃES, C.E.C., MAIOA, G.A., LEMOS, T.L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil **Food Research International**, v. 11, p. 2155-2159, 2011.

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

ANTUNES, A. E. C., LISERRE, A. M., COELHO, A. L. A., MENEZES, C. R., MORENO, I., YOTSUYANAGI, K., ET AL. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013.

ATALAR, I., DERVISOGLU, M. Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 751-757, 2015.

BARROS, R.G.C., ANDRADE, J.K.S., DENADAI, M., NUNES, M.L., NARAIN, N.. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. **Food Research International**, v. 102, p. 84–92, 2017.

BATAGLION, G. A., DA SILVA, F. M. A., EBERLIN, M. N., & KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLCMS/MS. **Food Chemistry**, v.180, p. 280–287, 2015.

BELWAL,T., DEVKOTA,H.P., HASSAN, H. A., AHLUWALIA,S., RAMADAN, M.F., MOCAN, A., ATANASOV, A.G. Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia spp.*) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v.74, p. 99–106, 2018.

BERGILLOS-MECA,T; CABRERA-VIQUE, C. ; ARTACHO, R.; MORENO-MONTORO,M.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; OLALLA, M.; GIMÉNEZ, R.; SEIQUER,I.; RUIZ-LÓPEZ, M.D. Does *Lactobacillus plantarum* or ultrafiltration process improve Ca, Mg, Zn and P bioavailability from fermented goats' milk? **Food Chemistry**, v. 187, p.314–321, 2015.

BETORET, E.; BETORET N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

BOSNEA, L. A., MOSCHAKIS, T., & BILIADERIS, C. G. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. **Food Bioprocess and Technology**, v. 7, p.2767-2781,2014.

BULE, M.V., SINGHAL, R.S., KENNEDY, J.F. Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improve stability. **Carbohydrate Polymers**. v. 82, p.1290–1296, 2010.

BUSTAMANTE ,M.; VILLARROEL, M.; RUBILAR,M.; SHENE, C. *Lactobacillus acidophilus* La-05 encapsulated by spray drying: Effect of mucilage and protein from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v.62, p. 1162-1168, 2015.

CAPPATO, L.P., FERREIRA, M.V.S., PIRES, R.P.S., CAVALCANTI, R.N., BISAGGIO, R.C., FREITAS, M.Q., SILVA, M.C., CRUZ, A.G. Whey acerola-flavoured drink submitted ohmic heating processing: Is there an optimal combination of the operational parameters? **Food Chemistry**,v. 245, p. 22–28, 2018.

CARVALHO, P. C. L.; RITZINGER, R.; SOARESFILHO, W. S.; LEDO, C. A. S. Características morfológicas, físicas e químicas de frutos de populações de umbu-cajazeira no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, p.140-147, 2008.

CEBALLOS,A.M.,GIRALDO,G.I.,&ORREGO,C.E. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. **Journal of Food Engineering**, v.111,p. 360–365, 2012.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v.66. p. 572-581, 2016.

CORONA-HERNANDEZ, R.I., ALVAREZ-PARRILLA, E., LIZARDI-MENDOZA, J., ISLAS-RUBIO, A.R., DE LA ROSA, L.A., WALL-MEDRANO, A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.12, p.614-628,2013.

CUI, X. H., CHEN, S. J., WANG, Y., & HAN, J. R. Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, p. 349-352, 2013.

DRUSCH, S.; REGIER, M.; BRUHN, M. Recent advances in the microencapsulation of oils high in polyunsaturated fatty acids. **Novel Technologies in Food Science**, Nova Iorque, Springer, v. 7, p. 159-181, 2012.

DU, J., CULLEN, J.J., BUETTNER, G.R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1826 , p. 443–457, 2012.

FALCÃO, A.P.; CHAVES, E.S.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R.; FLACÃO, L.D.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 637-642, 2007.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, p.34, 2001. [Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacter]. Disponível em: [Http:// www.fao.org/3/a-a0512e.pdf](http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf). Acessado em 30/05/17.

FAZAELI, M., EMAM-DJOMEH, Z., ASHTARI, A.K., OMID, M. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food Bioprocess. Processing**. v. 90, p. 667-675, 2012.

FELIPE, K.B., BENITES, J., GLORIEUX, C., SID, B., VALENZUELA, M., KVIECINSKI, M.R., PEDROSA, R.C., VALDERRAMA, J.A., LEVÊQUE, P., GALLETZ, B., VERRAX, J., BUC CALDERON, P. Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, p. 573–578, 2013.

FELS, L., JAKOB, F., VOGEL, R. F., WEFERS, D. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. **Carbohydrate Polymers**,v.189, p.296–303, 2018.

FEUCHT, A.; KWAK, H.S. Microencapsulation of lactic acid bacteria (LAB). **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 33, p.229-238,2013.

FIORDA, F.A.; PEREIRA, G.V.M; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEDEIROS, A.P.; AKSHIT, S.K.; SOCCOL, C.R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT - Food Science and Technology** v.68, p.690-697, 2016.

FRITZEN-FREIRE, C. B., PRUDENCIO, E. S., AMBONI, R. D. M. C., PINTO, S. S., NEGRAO-MURAKAMI, A. N., & MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v.45,p.306-312, 2012.

GALLIE, D.R. Ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. **Scientifica**,2013.

GAROFALO, C., OSIMANI, A., MILANOVIC, V., AQUILANTI, L., DE FILIPPIS, F., STELLATO, G. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**, v. 49, p.123-133, 2015.

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

GIL-RODRÍGUEZ, A.M.; CARRASCOSA, A.V.; REQUENA, T. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. **LWT - Food Science and Technology** v. 64, p.1156-1162, 2015.

GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETTI, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço da maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 727-732, 2008.

GREPPI A.; SAUBADE, F.; BOTTA, C.; HUMBLLOT C.; GUYOT, J.; COCOLIN, L. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. **Food Microbiology**, v. 62, p.169-177, 2017.

HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**,v.46, p.205-229, 2003.

HUQ, T., KHAN, A., KHAN, R.A., RIDEL, B., LACROIX, M., Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.53, p.909-916, 2013.

HUSSAIN, S. A.; PATIL, G. R.; YADAV, V.; SINGH, R.R.B.; SINGH, A. K. Ingredient formulation effects on physico-chemical, sensory, textural properties and probiotic count of Aloe vera probiotic dahi. **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p.371-380, 2016.

IÇIER, F.; GÜNDÜZ, G.T.; YILMAZ, B.; MEMELI, Z. Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.57-64, 2015.

ISLAM, M.Z.; KITAMURA, Y.; YAMANO, Y.; KITAMURA, M. Effect of vacuum spray drying on the physicochemical properties, water sorption and glass transition phenomenon of orange juice powder. **Journal of Food Engineering**. v.169, p.131-140, 2016.

JOYE, I. J.; McCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid and Interface Science, Amsterdam**, v.19, p. 417- 427, 2014.

KADERIDES, K; GOULA, A.M. Development and characterization of a new encapsulating agent from orange juice by-products. **Food Research International**, v. 100, p. 612–622, 2017.

KOSIR, I. J.; ANDRENESEK, S.; WONDRA, A. G.; VRHOVSEK, U.; KIDRIC, J. Identification of anthocyanins in wine by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. **Analytical Chimica Acta**, v. 513, p. 277-282, 2004.

KRISHNAIAH, D., NITHYANANDAM, R., SARBATLY, R. A critical review on the spray drying of fruit extract: effect of additives on physicochemical properties. **Critical Review Food Science and Nutrition**, 2014.

LAUREYS, D., DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p.2564–2572, 2014.

LIRA JÚNIOR JS, MUSSER RS, MELO EA, MACIEL MIS, LEDERMA NIE, SANTOS VF Caracterização física e físico-química de frutos de cajá-umbu (*Spondias* spp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.757-761, 2005.

MA, G.; ZHANG, L.C.; KATO, M.; YAMAWAKI, K.; ASAI, T.; NISHIKAWA, F.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; KAMISAKO, T. Effect of electrostatic atomization on ascorbate metabolism in postharvest broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v. 74, p.19–25, 2012.

MA, G.; ZHANG, L.C.; KATO, M.; YAMAWAKI, K.; ASAI, T.; NISHIKAWA, F.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; YAMAUCHI, T.; KAMISAKO, T.; MAEZAWA, S.; SATO, H.; KANEMITSU, N.; KATO, M. Effect of red and blue LED light irradiation on ascorbate content and expression of genes related to ascorbate metabolism in postharvest broccoli, **Postharvest Biology and Technology**. v.94, p.97–104, 2014.

MALEGORI, C., MARQUES, E.J.N., FREITAS, S.T. PIMENTEL, M.F.P., PASQUINI, C., CASIRAGHI, E. Comparing the analytical performances of Micro-NIR and FT-NIR spectrometers in the evaluation of acerola fruit quality, using PLS and SVM regression algorithms. **Talanta**, v.165, p. 112–116, 2017.

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

MARTINS, E.M.F., RAMOS, A.M., VANZELA, E.S.L., STRINGHETA, P.C., DE OLIVEIRA PINTO, C.L., MARTINS, J.M. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, 2013.

MIRA, N.V.M.; BARROS, R.M.C.; SCHIOCCHET, M.A.; NOLDIN, J.A.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza saliva* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, p. 994-1002, 2008.

NARAIN, N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, S. M. Volatile compounds captured through purge and trap technique in cajá-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation. **Food Chemistry**, v.102, p.726-731, 2007.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469– 479, 2013.

NIKOLAOU, A.; GALANIS, A.; KANELLAKI, M. ; TASSOU, C.; AKRIDA-DEMERTZI, K.; KOURKOUTAS, Y. Assessment of free and immobilized kefir culture in simultaneous

alcoholic and malolactic cider fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v.76, p.67-78, 2017.

NURHADI, B., ROOS, Y. H., & MAIDANNYK, V. Physical properties of maltodextrin DE 10: water sorption:water plasticization and enthalpyrelaxation. **Journal of Food Engineering**, 174, 68–74, 2016.

OBEROI, D. P. S.; SOGI, D. S. Effect of drying methods and maltodextrin concentration on pigment content of watermelon juice powder. **Journal of Food Engineering**,v. 165 p.172–178, 2015.

OLUDEMI, F.O.; AKANBI, C. T. Chemical, antioxidant and sensory properties of tomato-watermelon-pineapple blends, and changes in their total antioxidant capacity during storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v.48, p.1416– 1425, 2013.

OMENA, C.M.B., VALENTIM, I.B., GUEDES, G.S. RABELO, L.A. MANO, C.M. , BECHAA, E.J.H., GOULART, M.O.F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v.49, p. 334-344, 2012.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**.v. 29, p. 897-910, 2005.

PAZ, M., GÚLLON, P., BARROSO, M.F., CARVALHO, A.P., DOMINGUES, V.F., GOMES, A.M. DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v.172, p. 462-488, 2015.

PEREIRA,C.G., RESENDE,J.V., GIAROLA, T.M.O. Relationship between the thermal conductivity and rheological behavior of acerola pulp: Effect of concentration and temperature **LWT - Food Science and Technology**, v.58,p. 446-453,2014.

PERRICONE, M., BEVILACQUA, A., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., CORBO, M. Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages** v.1, p.95 -103.2015

PHISUT, N. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing pulps: spouted bed process optimization as a function of pulp composition. **Dry Technology**. p.29, 2011.

PRISCO, A., MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology** v. 48, p. 27-39, 2016.

PUERARI, C., MAGALHÃES, K. T., & SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v.48,p. 634-640, 2012.

PYCIA, K., JUSZCZAK, L., GAŁKOWSKA, D., WITCZAK, M., JAWORSK, G. Maltodextrins from chemically modified starches Selected physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 301–309, 2016.

RANDAZZO, W., CORONA, O., GUARCELLO R., FRANCESCA, N., GERMAN, M.A., ERTEN, H., MOSCHETTI G., SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40-51, 2016.

RAY,S., RAYCHAUDHURI,U., CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology.**Food Bioscience**,v.13, p.76–83, 2016.

RODRIGUES C.N.B., SOUZA P.A., COELHO E.L., SOUZA F.X., FREITAS R.V.S. Qualidade de frutos de cajazeira em diferentes estádios de maturação provenientes de clones cultivados no Ceará. **Revista Caatinga**, v. 25, p.38-43, 2012.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., PÉREZ-JIMÉNES, J., SAURA-CALIXTO, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SATIR G., GUZEL-SEYDIM Z. B. How kefir fermentation can affect product composition? **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 1-7, 2016.

SATIR G., GUZEL-SEYDIM Z. B. Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. **LWT - Food Science and Technology**,, v. 63, p. 852-858, 2015.

SHAHIDI, F., AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.820–897, 2015.

SHISHIR, M.R.I.S. ,CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p.49-67, 2017.

SILVA, L. M. R., FIGUEIREDO, E. A. T., RICARDO, N. M. P. S., VIEIRA, I. G. P., FIGUEIREDO, R. W., BRASIL, I. M. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.143, p.398–404, 2014.

SILVA, L.R.; ALVES, R. E.; SILVA, S.M.;NOGUEIRA, D.H. Caracterização físico-química de frutos dos fenótipos de umbu-cajazeiras oriundos da microrregião de iguatu,CE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, p. 1647-1659, 2015.

SILVA, P. B., DUARTE, C. R., & BARROZO, M. A. S. Dehydration of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue in a new designed rotary dryer: Effect of process variables on main bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v.98, p. 62–70, 2016.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEOFILO, R. F.; OLIVEIRA, I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 17, p. 538–544, 2013.

SILVA, P.D. L; BEZERRA, M.F.; SANTOS, K.M.O.; CORREIA, R.T.P. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v.62, p. 452-457, 2015.

SOUZA, V.R., PEREIRA, P.A., QUEIROZ, F., BORGES, S.V., CARNEIRO, J.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v.134, p. 381-386, 2012.

STALIANO, C.D.; MARTINEZ, R.C.R.; SAAD, S.M.I. Beneficial microorganisms viability and sensory acceptance of a potentially synbiotic dairy-based tomato spread **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 682-688, 2015.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A. WELNA, M.; JEDRYCZKO, D.; POHL P. Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices. **Trends in Analytical Chemistry**, v.55, p.68–80, 2014.

UROIC, K.; NOVAK, J.; HYNCONEN, U.; PIETILC, E.T.; PAVUNC, A.L.; KANT, R.; KOS, B.; PALVA,A.; SUSKOVIC, J. The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v.69, p. 623-632, 2016.

VALENZUELA, C., AGUILERA, J.M. Effects of maltodextrin on hygroscopicity and crispness of apple leathers. **Journal of Food Engineering**, v.144, p. 1-9, 2015.

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

WANG, S.; HO, Y.; CHEN, Y.; CHEN, M. Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefirianofaciens* M1. **Food Microbiology**, v.46, p 494-500, 2015.

YONEKURA, L., SUN, H., SOUKOULIS, C., FISK, I. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v.6, p. 205-214, 2014.

YUSRANI, E., HARIYADI, P. KUSNANDAR, F. Preparation and partial characterization of low dextrose equivalent (DE) maltodextrin from banana starch produced by enzymatic hydrolysis. **Starch/Stärke**, v.65, p.312–321, 2013.

ZERAIK, M.L., QUEIROZ, E.F., MARCOURT, L., CICLET, O., CASTRO-GAMBOA, I., SILVA, D.H.S., WOLFENDER, J. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 396-405, 2016.

ZHANG, L.; MA, G.; YAMAWAKI, K.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; YOSHIOKA, T.; OHTA, S.; KATO, M. Regulation of ascorbic acid metabolism by blue LED light irradiation in citrus juice sacs. **Plant Science**, 233, p. 134–142, 2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item será apresentado no formato de dois artigos científicos.

5.1. ARTIGO 1. LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS.

RESUMO

A utilização de sucos de frutas desidratados que mantenham as características sensoriais e presença de bioativos vem crescendo por ser mais prático. Dentre os compostos com alegações funcionais, os probióticos tem se destacado, principalmente o kefir, por melhorar a saúde intestinal e elevar a imunidade. O objetivo desta pesquisa foi determinar a melhor formulação de liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico, que apresente maior retenção de compostos fenólicos, ácido ascórbico e viabilidade microbológica. Para tanto, o kefir foi reativado por *backslopping* e inoculado nas proporções (25% e 50%) nas polpas isoladas de acerola e umbu-cajá. A taxa de diluição de 25% de kefir para 75% de bebida mista, definida como ideal, foi utilizada nas formulações para definir a melhor formulação de bebida probiótica (9 ensaios), e avaliadas quanto a retenção de bioativos (polifenóis e ácido ascórbico) e de células viáveis de probióticos. A formulação com 90% de umbu-cajá e 10% de acerola, por ter obtido desempenho satisfatório na fermentação, foi submetida a delineamento experimental 2^3 (17 ensaios) para definir as condições de secagem, tendo como variáveis independentes a temperatura do ar de secagem (-30°, -34°, -40°, -46° e -50°C), percentual de sacarose (5, 7, 10, 13 e 15) e percentual de maltodextrina 10DE (10, 12, 15, 18 e 20). O processo utilizando a temperatura de -40°C, 10% de sacarose e 15% de maltodextrina, produziu as melhores respostas, e foi caracterizado com higroscopicidade de 13,13g.100g⁻¹, densidade aparente de 0,52g.mL⁻¹, rendimento de 39,21% e solubilidade de 37,07%. Todos os dados foram obtidos em triplicata e submetidos aos testes t-Student, DUCAN e ANOVA, análise de variância e teste de médias, além de análises multivariadas e de correlação. Os dados obtidos proporcionaram o desenvolvimento de protocolos científicos para elaboração de liofilizado a base bebida probiótica de umbu-cajá e acerola em conformidade com os padrões da Legislação vigente. Os resultados ressaltam a importância da pesquisa para o fortalecimento da cadeia produtiva das frutas, principalmente no nordeste brasileiro, onde a cultura do umbu-cajazeiro e da aceroleira tem provocado interesses econômicos.

Palavras-chave: sucos, liofilização, kefir

ABSTRACT

The use of dehydrated fruit juices that maintain the sensorial characteristics and presence of bioactive products has been growing because it is more practical. Among the compounds with functional claims, probiotics has been prominent, mainly kefir, for improving intestinal health and elevating immunity. The objective of this research was to determine the best freeze-dried formulation of umbu-cajá and acerola probiotic, which shows higher retention of phenolic compounds, ascorbic acid and microbiological viability. For this, kefir was reactivated by backslopping and inoculated in proportions (25% and 50%) in the isolated pulps of acerola and umbu-cajá. The 25% kefir to 75% mixed drink dilution rate, defined as ideal, was used in formulations to define the best probiotic beverage formulation (9 trials), and evaluated for bioactive retention (polyphenols and ascorbic acid) and viable probiotic cells. The formulation with 90% of umbu-cajá and 10% of acerola, for having obtained satisfactory performance in the fermentation, was submitted to an experimental design 2^3 (17 tests) to define the drying conditions, having as independent variables the drying air temperature (-30 °, -34 °, -40 °, -46 ° and -50 ° C), percentage of sucrose (5, 7, 10, 13 and 15) and percentage of maltodextrin 10DE (10,12,15,18 and 20). The process using a temperature of -40 ° C, 10% sucrose and 15% maltodextrin produced the best responses and was characterized with hygroscopicity of 13.13g.100g⁻¹, apparent density of 0.52g.mL⁻¹, yield of 39.21% and solubility of 37.07%. All data were obtained in triplicate and submitted to Student's t-test, DUCAN and ANOVA, analysis of variance and test of means, as well as multivariate and correlation analyzes. The data obtained provided the development of scientific protocols for the preparation of the lyophilized probiotic beverage base of umbu-cajá and acerola in accordance with the standards of the current legislation. The results highlight the importance of the research for the strengthening of the fruit production chain, mainly in the Brazilian northeast, where the culture of the umbu-cajazeiro and the cherry tree has provoked economic interests.

Key-word: juices, freeze-drying, kefir.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo de frutas tropicais tem aumentado no mercado brasileiro e internacional devido ao crescente reconhecimento do seu valor como preventivo de doenças. Entretanto, o Brasil possui um grande número de espécies frutíferas nativas e exóticas pouco exploradas, com potencial interesse para agroindústrias e possível fonte de renda para o pequeno agricultor (DUTRA et al, 2017; RUFINO et al, 2010).

O uso dessas frutas para o desenvolvimento de novos produtos com apelo funcional atende ao mercado consumidor, cada vez mais focado em produtos que tragam benefícios à saúde, principalmente, produtos probióticos de fontes não lácteas (CORONA et al, 2016; ANTUNES et al, 2013; MARTINS et al, 2013).

Além disso, os sucos de frutas, por serem perecíveis, necessitam de uma cadeia de elaboração, transporte e armazenamento que garanta estabilidade físico-química e microbiológica. O emprego de técnicas de conservação de alta eficiência, como o encapsulamento, preserva os componentes de interesse por meio de revestimento que permite a formação de uma barreira física entre o meio externo e os materiais sensíveis do núcleo, protegendo esses compostos da umidade, pH e oxidação (DRUSCH et al., 2012; NESTERENKO et al., 2013). Dentre estas técnicas a liofilização, com maior eficiência para produtos em pó, emprega secagem por sublimação da água (SHISHIR e CHEN, 2017), com a vantagem de preservar a viabilidade microbiológica de microrganismos probióticos (ALVES et al., 2016).

A elaboração de suco de fruta com efeito probiótico em base não láctea abre um novo leque de oportunidades para os consumidores (ALVES et al., 2016; CORONA, et al., 2016; PERRICONE et al., 2015). Ademais, a apresentação na forma de pós representa um mercado promissor, uma vez que nesta forma física temos aumento da estabilidade, facilidade de reconstituição, possibilidade de uso como corante e flavorizante em produtos alimentícios e elevação do valor nutricional (BETORET et al., 2011).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a melhor formulação de liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico, que apresente maior retenção de compostos fenólicos, ácido ascórbico e viabilidade microbiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra e local de realização da pesquisa e obtenção da matéria-prima

As polpas de umbu-cajá e acerola utilizadas foram extraídas de frutos adquiridos no Centro de Abastecimento Alimentar de Pernambuco no estágio maduro, segundo sua coloração uniforme. Os frutos foram selecionados, lavados, sanitizados com água clorada (teor de cloro ativo de 2,38%v/v) e despulpados utilizando uma centrífuga para alimentos (Juicer Philips Walita 1000w). As polpas obtidas foram acondicionadas em sacos de polietileno de alta densidade e imediatamente congeladas ($-20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) e mantidas até o momento da utilização.

Para obtenção do liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico foram utilizados os Laboratórios de Microbiologia do Departamento de Tecnologia Rural e o Laboratório Multiusuário do Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq) da UFRPE. As análises físico-químicas foram realizadas nos Laboratórios de Análises Físico-químicas de Alimentos do Departamento de Ciências Domésticas da UFRPE e no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos – Nonete Barbosa Guerra do Departamento de Nutrição da UFPE. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia Rural da UFRPE.

Obtenção e ativação do kefir

Os grãos de kefir de água liofilizados foram adquiridos na Probióticos Brasil[®] (São Paulo). Os grãos de Kefir continham, segundo o fornecedor, uma simbiose de 14 microrganismos identificados pela empresa: bactérias (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus hordeji*, *Lactobacillus nagelii*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter orientalis*, *Streptococcus lactis*) e leveduras (*Hanseniaspora valbyensis*, *Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygorulasporea florentina*). A reativação dos microrganismos liofilizados foi feita por *backslipping*, seguindo recomendações do fornecedor, no qual os grãos de kefir liofilizados (0,125 g) foram inoculados em água (300 mL) com açúcar mascavo (20g) a $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48h, para o desenvolvimento do inoculante e subsequente troca do inóculo.

Preparo do liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico

Seleção da taxa de diluição da bebida probiótica

As taxas de diluição, 50% e 75%, foram estabelecidas em função do “Regulamento Técnico Para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais Para Suco Tropical” da Instrução Normativa Nº 12, de 4 de setembro de 2003 que determina que “O Suco Tropical, cuja quantidade mínima de polpa de uma determinada fruta não tenha sido fixada em Regulamento Técnico específico, deve conter um mínimo de 50% (m/m) da respectiva polpa, ressalvado o caso de fruta com acidez alta ou conteúdo de polpa muito elevado ou sabor muito forte que, neste caso, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 35%(m/m)”.

As polpas de umbu-cajá e acerola foram submetidas a testes preliminares cuja finalidade foi determinar a taxa de diluição que seria utilizada nas bebidas probióticas, de modo que, para cada 75% e 50% m/m das polpas isoladas de umbu-cajá e acerola foram adicionados, respectivamente, 25% e 50% do fermentado de grãos de kefir. Em seguida, os quatro ensaios contendo 100 mL das bebidas foram submetidos à fermentação em estufa por 24 horas a $30^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, foi realizada análise da adaptabilidade do kefir às polpas por meio da análise de determinação do número de células viáveis.

Seleção da melhor formulação

Foram utilizadas 9 formulações nos tratamentos para elaboração da bebida probiótica (Tabela 1) e a taxa de diluição definida no teste preliminar perfazendo um volume total de 100 mL das bebidas mistas que foram submetidos à fermentação por 24 horas a $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1. Formulações usadas nos tratamentos para elaboração da bebida probiótica.

Combinação	Umbu-cajá (%)	Acerola (%)
1	90	10
2	80	20
3	70	30
4	60	40
5	50	50
6	40	60
7	30	70
8	20	80
9	10	90

A seleção da melhor formulação do produto considerou como indicadores o maior número de células probióticas viáveis e as maiores taxas de retenção de polifenóis totais e de ácido ascórbico.

Secagem em Liofilizador

Planejamento fatorial para escolha da melhor condição de encapsulamento

Os ensaios foram realizados por meio de um delineamento composto central rotacional 2^3 completo com 17 ensaios. O planejamento tem como objetivo avaliar a influência das variáveis independentes (temperatura de secagem e concentração dos agentes carreadores – sacarose e maltodextrina) sobre as variáveis dependentes (umidade e atividade de água - excludente e viabilidade microbiológica – determinante).

Após determinação dos melhores ensaios do planejamento anterior, as amostras foram submetidas às análises para determinar a taxa de retenção do ácido ascórbico e polifenóis totais.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os níveis codificados e decodificados das variáveis independentes.

Tabela 2. Níveis codificados das variáveis independentes planejamento fatorial 2³.

Codificação	Sacarose (%)	Maltodextrina (%)	Temperatura (°C)
-1,68	5	10	- 30
-1	7	12	- 34
0	10	15	- 40
1	13	18	- 46
1,68	15	20	- 50

Tabela 3. Níveis decodificados das variáveis independentes planejamento fatorial 2³.

Ensaio	Açúcar(%)	Maltodextrina (%)	Temperatura (°C)
1	7	12	-34
2	13	12	-34
3	7	18	-34
4	13	18	-34
5	7	12	-46
6	13	12	-46
7	7	18	-46
8	13	18	-46
9	5	15	-40
10	15	15	-40
11	10	10	-40
12	10	20	-40
13	10	15	-30
14	10	15	-50
15	10	15	-40
16	10	15	-40
17	10	15	-40

Preparação das amostras para processo de secagem

Para cada ensaio do planejamento, a bebida mista foi submetida à fermentação (Tabela 1), por agitação manual e auxílio de bastão de vidro estéril aos agentes encapsulantes (Tabela 2), vertidos em placas de petri (90x15mm) estéreis e descartáveis com tampa (20mL por placa), congelados a $-40^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de secagem em Liofilizador Piloto[®] sob vácuo constante de 0,133Pa por 16 horas e temperaturas descritas no planejamento fatorial (Tabela 2). Os agentes carreadores utilizados foram a maltodextrina dextrose equivalente 10 (DE) e sacarose. O produto em pó foi coletado e acondicionado em potes de polietileno (50mL)

descartáveis, estéreis e fechados hermeticamente, sendo armazenados sob congelamento (-20°C).

Análises Microbiológicas

Determinação do número de células viáveis

Para a determinação microbiológica, alíquotas de 25 mL dos fermentados foram diluídas com 225 mL de solução 0,1%v/v de água peptonada estéril (10^{-1}). Após homogeneização foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-6} . Após a realização das diluições, foram retiradas alíquotas de 1 mL, em triplicata, das três últimas diluições e inoculadas pelo método de contagem por plaqueamento em profundidade, em placas de petri (90x15mm) descartáveis, separadas e vazias nas quais foram vertidos aproximadamente 15mL de meio de cultura Agar MRS Kasvi[®], previamente fundido e resfriado a $45^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após completa solidificação, as placas foram incubadas em estufa a $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48h. A contagem das colônias foi realizada com o auxílio de contador de colônias com lupa. Os resultados foram expressos em $\log\text{UFC.g}^{-1}$.

Perfil cinético de crescimento microbiano

Foi realizado o perfil cinético de crescimento microbiano para o conhecimento do maior número de células viáveis em relação ao tempo de fermentação. Estabelecido o melhor tempo de incubação do kefir foi possível padronizar o tempo da fermentação do inóculo antes da inoculação nas bebidas mistas. A melhor combinação das bebidas mistas também foi submetida ao perfil cinético visando melhor entendimento do comportamento e adaptabilidade dos microrganismos à bebida. Para tanto, o kefir foi previamente fermentado por 48h e diluído na bebida mista na proporção 1:4. As amostras foram analisadas nos seguintes tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48 e 72 h para determinar seu crescimento ao longo do tempo. Os resultados foram expressos em $\log\text{UFC.mL}^{-1}$ (MESQUITA et al., 2017).

Análises Físico-químicas

Caracterização clássica das amostras

Teor de sólidos solúveis (SS)

O teor de SS foi determinado utilizando o refratômetro Atago[®] (modelo Master-T), com escala de 0 a 32 °Brix. Uma alíquota da amostra foi colocada sobre o prisma do aparelho e realizada leitura direta do teor de sólidos solúveis expresso em °Brix.

Potencial hidrogeniônico (pH)

Foi determinado com medição direta no pHmetro digital Tecnal[®] (modelo TEC-5), devidamente aferido com solução tampão de pH 4,0 e 7,0.

Atividade de água (Aw)

A atividade de água foi determinada por meio do aparelho analisador de atividade de água Aqualab[®] (modelo 4TE), a 25°C. Este equipamento se baseia no método da temperatura do ponto de orvalho por resfriamento e condensação em espelho, para determinar a atividade de água.

Teor de umidade

Para determinação, foi utilizado o aparelho determinador de umidade Marte[®] (modelo IDSO) que operou na temperatura de 105°C durante 30 minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade.

Densidade Aparente

Foram transferidas 2g da amostra para proveta graduada de 10mL, sob agitação manual contínua e sincronizada. A densidade foi calculada de acordo com a equação $D_p = m/v$ onde, m é a massa da amostra(g) e v o volume total do pó compactado na proveta (mL) (BARBOSA-CANOVA et al., 2005).

Higroscopicidade

Foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Cai e Corke (2000). As amostras (1g) foram colocadas em um recipiente hermético contendo uma solução saturada de cloreto de sódio (umidade relativa de 75,29%) a 25°C e, após uma semana foram pesadas, sendo a higroscopicidade expressa em g de umidade adsorvida por 100g de massa seca da amostra ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Solubilidade

Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Cano-Chauca et al. (2005), diluindo 1g da amostra em 100 mL de água destilada, agitando em agitador magnético Fisatom[®] (modelo 752), por 5 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos, em centrífuga Cientec[®] (modelo CT-6000R). Posteriormente, uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi retirada e colocada em placa de Petri, esterilizada e previamente pesada. A solução aquosa foi então levada para estufa com circulação e renovação de ar Marconi[®] (modelo MA-035), a 105°C por 5 h. Ao término do processo, a placa foi pesada em balança analítica com resolução de 0,00001g, e a solubilidade obtida por meio da diferença de peso.

Determinação de composto bioativos

Obtenção dos extratos

Extratos etanólicos das polpas e das bebidas formuladas (bebida mista, bebida probiótica e liofilizado) foram obtidos utilizando extração sequencial. Alíquotas de 5g das amostras foi adicionado a 60mL da solução extratora (solução aquosa de etanol 60%v/v acidificada com 2%p/v de ácido cítrico) e colocadas em agitação (Agitador magnético Fisatom[®] modelo 752 a $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida, o extrato etanólico foi centrifugado a 4000rpm em centrífuga Cientec[®] (modelo CT-6000R), por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado e o volume final aferido para 100mL com a solução extratora (ANDRADE et al, 2015 – modificado: substituição da acetona por etanol e acidificação com ácido cítrico). As amostras foram extraídas em triplicata.

Polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada, após diluição dos extratos a 0,1%v/v em água e reação com reagente fenólico Folin-Ciocalteu estabilizada com solução saturada de carbonato de sódio, por leitura da absorbância a 725 nm em espectrofotômetro Varian® 50 Bio UV/Vis, com cubeta de quartzo (percurso ótico 1 cm). Os resultados foram expressos, com base em curva analítica em mg.L^{-1} de equivalentes de ácido gálico, $y = 0,09860x + 0,10755$ ($r^2 = 0,9977$) (GIOVANELLI e BURATTI, 2009).

Ácido Ascórbico

A concentração de ácido ascórbico foi determinada por método titulométrico utilizando 2,6-diclorofenol-indofenol como titulante e solução de ácido acético e ácido oxálico como indicador, com ponto de virada na coloração rosa (AOAC, 2002).

Determinação da cor objetiva

O sistema CIELAB estabelece os parâmetros colorimétricos definidos pelo espaço tridimensional da cor. Desta forma, a partir das coordenadas nos eixos L^* (luminosidade), a^* (verde – valores negativos e vermelho – valores positivos) e b^* (azul – valores negativos e amarelo – valores positivos) pode-se obter a saturação da cor assim como o C^* indicam a contribuição dos valores positivos de a^* e b^* na coloração do produto (BURIN et al., 2010).

A colorimetria de triestímulos foi utilizada para obtenção dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) com iluminante cor objetiva de 2° , por leitura direta das amostras, em ausência de luz, no colorímetro Minolta CR-400®. A intensidade da cor (C^*) e a tonalidade cromática (H^*) foram calculadas por meio das equações $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $H^* = \arctg(b^*/a^*)$, respectivamente (CAILLÉ et al., 2009).

Análise Estatística

Todos os dados foram obtidos em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão. Foram aplicados os testes t-Student, DUNCAN e ANOVA, todos com nível de significância de $p < 0,05$, para identificar possíveis diferenças entre as médias no estabelecimento das proporções das bebidas probióticas e nas variáveis dependentes do planejamento fatorial entre as bebidas probióticas e as bebidas mistas em cada ensaio. As superfícies de resposta foram utilizadas para melhor mensuração das interações entre as variáveis independentes e a viabilidade microbológica. A análise de componentes principais ($p < 0,05$) foi utilizada para agrupar os tratamentos do planejamento fatorial em função das

variáveis dependentes que apresentaram diferença significativa entre os ensaios. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no *Statistic 7.0® software* (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção da taxa de diluição da bebida mista

A taxa de diluição da bebida é determinante para padronização do inóculo antes do processo fermentativo. O pH e concentração de sólidos solúveis totais são componentes básicos das condições intrínsecas de alimentos submetidos à fermentação e fatores importantes para o crescimento microbiano. Analisando os resultados na Tabela 4 é possível observar que a taxa de diluição é diretamente proporcional à concentração de sólidos solúveis das amostras, diferindo significativamente em ambas amostras, e inversamente proporcional ao pH para acerola porém sem interferência significativa ($p < 0,05$) no pH dos mesmos.

Com relação à viabilidade microbiológica (Tabela 4) é possível verificar que, independente da taxa de diluição, o kefir possui uma rápida adaptabilidade as frutas ácidas alcançando $\log\text{UFC.g}^{-1}$ em níveis probióticos, corroborando estudos realizados por Corona et al. (2016) e Randazzo et al. (2016). Além disso, ao comparar as amostras verificou-se que o kefir apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na amostra de umbu-cajá com maior concentração de sólidos solúveis, independentemente do pH.

Tabela 4. Resultados da viabilidade microbiológica, pH e sólidos solúveis das polpas isoladas de umbu-cajá e acerola em diferentes diluições.

Polpa	Diluição (%)	Kefir	pH	SS
		Log UFC.g ⁻¹		(°Brix)
Umbu-cajá	50/50	6,63 ^b ± 0,04	2,51 ^a ± 0,04	4,90 ^b ± 0,00
	75/25	7,04 ^a ± 0,05	2,51 ^a ± 0,01	7,53 ^a ± 0,06
Acerola	50/50	6,58 ^A ± 0,11	3,07 ^A ± 0,01	2,73 ^B ± 0,06
	75/25	6,77 ^A ± 0,09	3,03 ^B ± 0,01	4,33 ^A ± 0,01

UFC: Unidade Formadora de Colônia; SS: sólidos solúveis. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste *t-Student* ($p < 0,05$), sendo minúsculas para comparações entre diluições do umbu-cajá e maiúsculas para a acerola.

Seleção da formulação usada para elaboração da bebida probiótica

A Tabela 5 apresenta os resultados dos ensaios para escolha da melhor combinação da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica. Todos os ensaios apresentaram carga

microbiana dentro da faixa probiótica (10^6 a 10^9 UFC.g⁻¹), sendo os ensaios C2, C3, C5, e C8 com as maiores concentrações de células viáveis.

Com relação à concentração de polifenóis totais e ácido ascórbico, o ensaio C1 obteve os maiores percentuais de retenção em ambos bioativos, apesar de apresentar as menores concentrações dos compostos estudados. Os ensaios com as maiores concentrações de acerola na composição da bebida probiótica (C9 e C8) apresentaram elevadas concentrações dos bioativos, porém estes compostos são mais suscetíveis à degradação durante o processo fermentativo. Neste contexto, observou-se que o ensaio C9, com 90% de acerola apresentou as maiores taxas de degradação de ambos bioativos (Tabela 5).

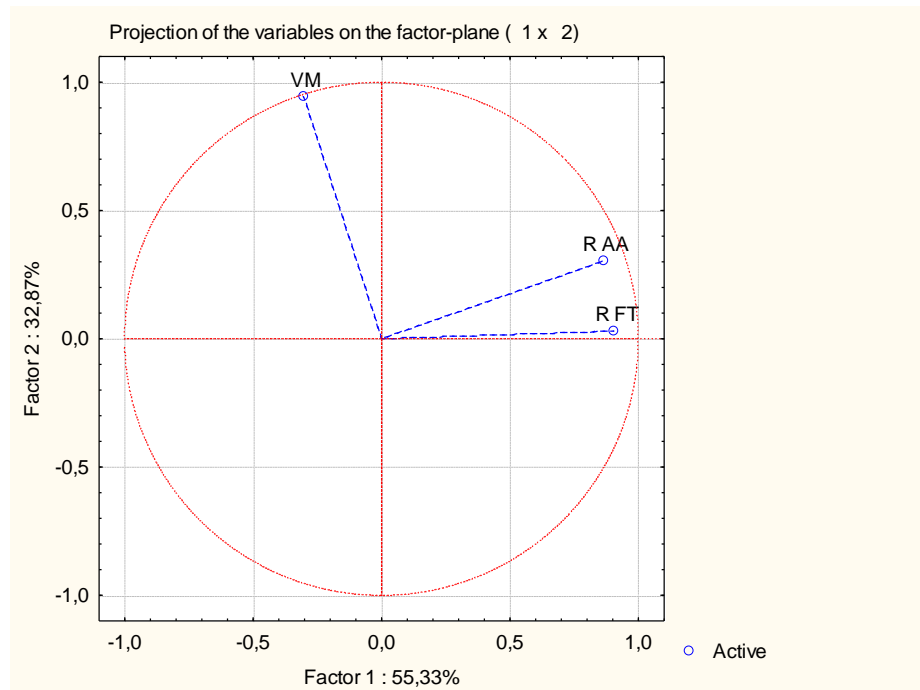
Tabela 5. Parâmetros de seleção para o melhor ensaio da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica

Ensaio	VM (Log UFC.g ⁻¹)	Ácido Ascórbico (mg.100g ⁻¹)			Polifenóis Totais (mg.100g ⁻¹)		
		BM	BP	% Ret.	BM	BP	% Ret.
C1	7,04 ^{c,d,e} ± 0,01	194,93 ^{IB} ±3,38	296,05 ^{9A} ±0,00	51,88	65,94 ^{Bh} ±0,12	207,56 ^{Ah} ±0,23	214,77
C2	7,11 ^{a,b,c} ± 0,08	282,47 ^{hA} ±3,06	263,16 ^{9B} ±0,00	-6,84	120,49 ^{Bg} ±0,10	247,52 ^{Ag} ±0,20	105,43
C3	7,172 ^{a,b} ± 0,08	401,34 ^{9A} ±3,76	416,67 ^{IA} ±18,99	3,82	180,05 ^{Bf} ±0,40	306,35 ^{Af} ±0,23	70,15
C4	7,108 ^{b,c} ± 0,05	577,00 ^{IB} ±3,37	614,04 ^{9A} ±37,98	6,42	185,17 ^{Bf} ±0,22	321,03 ^{Af} ±0,57	73,37
C5	7,201 ^a ± 0,02	649,30 ^{9B} ±0,31	690,79 ^{9A} ±0,00	6,39	285,49 ^{Be} ±7,34	378,25 ^{9Ae} ±1,77	32,49
C6	7,072 ^{c,d} ± 0,00	890,60 ^{dB} ±7,16	1096,5 ^{9Aa} ±37,98	23,12	320,50 ^{Bd} ±0,32	438,26 ^{Ad} ±1,09	36,74
C7	6,958 ^{d,e} ± 0,07	994,15 ^{Bc} ±10,13	1019,7 ^{Ab} ±0,0	2,57	872,16 ^{Bc} ±6,65	2756,4 ^{9Aa} ±1,1	216,04
C8	7,137 ^{a,b,c} ± 0,05	1204,70 ^{Ab} ±10,13	701,75 ^{Bd} ±37,98	-41,75	1363,10 ^{Bb} ±20,69	1636,00 ^{Ab} ±2,46	20,02
C9	6,903 ^e ± 0,03	1327,50 ^{9Aa} ±10,13	975,88 ^{9Bc} ±18,99	-26,49	1446,90 ^{9Aa} ±6,21	545,47 ^{9Bc} ±19,35	-62,30

VM: viabilidade microbiológica; UFC: Unidade Formadora de Colônia; BM: Bebida mista de umbu-cajá e acerola; BP: Bebida de umbu-cajá e acerola probiótica; %Ret.: Potencial de retenção. Letras maiúsculas iguais na horizontal na mesma análise não diferem significativamente teste *t-Student* ($p < 0,05$); Letras minúsculas iguais na vertical na mesma análise não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

A classificação dos ensaios foi mensurada pela análise de componente principal – ACP. A separação foi obtida utilizando a viabilidade microbiana e a retenção dos compostos bioativos (ácido ascórbico e polifenóis) (Figura 1).

(a)



(b)

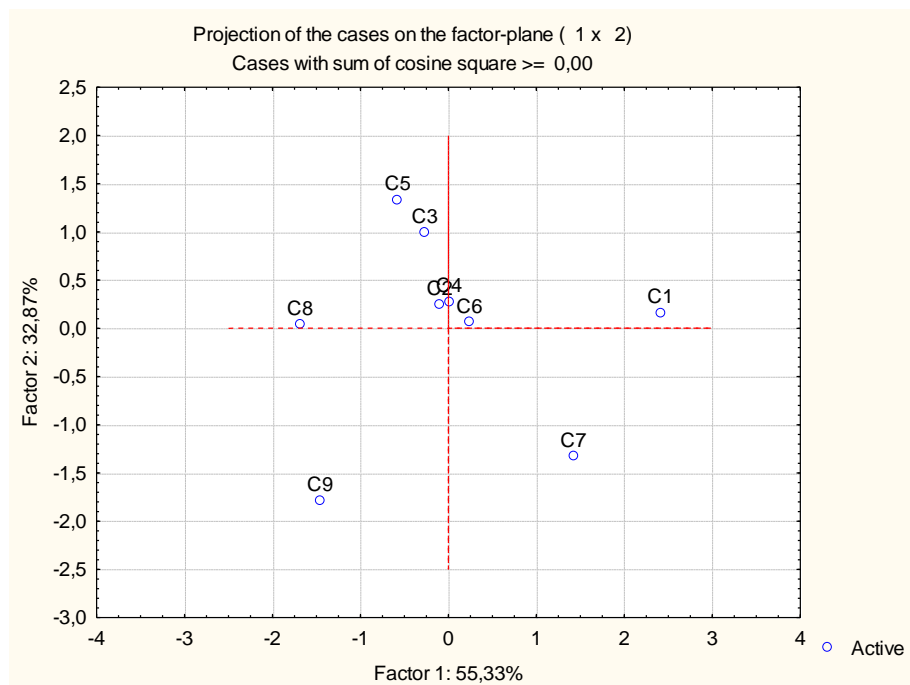


Figura 1. Contribuição das variáveis (a) viabilidade microbiana (VM), percentual de retenção do ácido ascórbico (%retAA) e percentual de retenção de polifenóis totais (%retPT) e distribuição dos ensaios (b) – (C1 a C9), no sistema de coordenadas definido pela primeira e segunda componente principal.

Analisando os *Loadings* e *Scores* observa-se que a CP1 (primeira componente principal) corresponde a 53,33% da variância total (Figura 1) onde o ensaio C1 caracteriza-se por elevados valores de retenção de polifenóis totais (%retPT) e ácido ascórbico

(%retAA), conforme Tabela 5. Em contrapartida, a segunda componente principal (CP2) representa 32,87% da variância total (Figura 1) e evidencia o ensaio C5 por possuir maior score positivo, ou seja, maior viabilidade microbiológica (VM). Entretanto, o ensaio C1 apresenta viabilidade microbiológica dentro da faixa probiótica, apesar de diferir significativamente ($p < 0,05$) dos ensaios com maior concentração microbiana (C3 e C5), sendo este o ensaio escolhido. (Tabela 5).

Perfil cinético de crescimento microbiano

Em geral, a produção de kefir e as atividades metabólicas resultantes desta simbiose microbiana são afetadas pela qualidade dos grãos de kefir, pela relação entre grãos e substrato e pelo tempo e temperatura de incubação (ALTAY et al, 2013; GÜZEL-SEYDIM et al, 2011). Além disso, várias interações podem determinar aumento ou diminuição do número de microrganismos de kefir (NAMBOU et al, 2014; SIEUWERTS et al, 2008). No presente estudo, foi realizado o perfil cinético de crescimento microbiano para o conhecimento do crescimento máximo microbiano do kefir em relação ao tempo de fermentação e após a seleção para o melhor ensaio da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica (formulação C1). Além disso, o melhor ensaio foi submetido ao perfil cinético visando melhor entendimento do comportamento e adaptabilidade dos microrganismos à bebida.

Os perfis de crescimento foram analisados por meio da curva de crescimento construída a partir do número de células viáveis em diferentes intervalos de tempo (Figura 2).

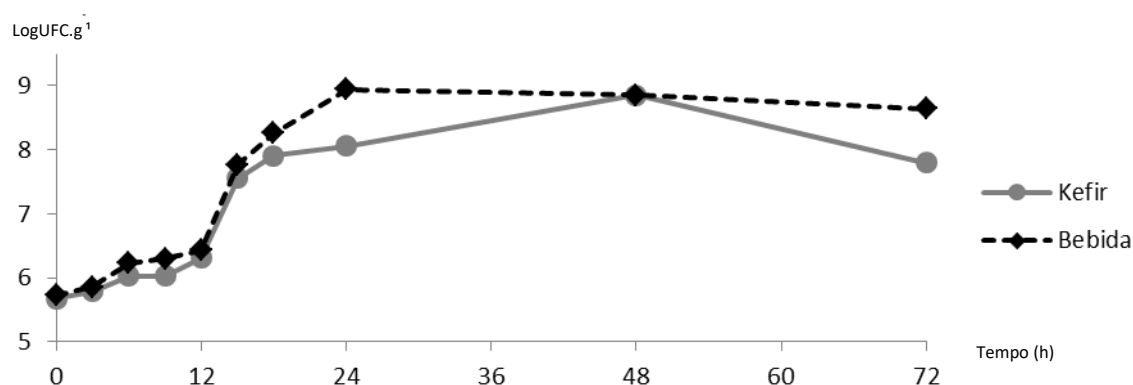


Figura 2. Gráfico da cinética do crescimento microbiano do kefir e bebida de umbu-cajá e acerola probiótica

Observa-se que o tempo de adaptação do kefir aos meios foi semelhante. Não foi visualizada diferença significativa ($p < 0,05$) de crescimento nas primeiras 12 horas

independentemente do meio ao qual o inóculo estava inserido. A fase de aceleração do kefir (fase log) na solução aquosa e na bebida se intensificaram após de 12 horas e, a partir de 15 horas, o crescimento do kefir na bebida ocorreu rapidamente atingindo seu ponto máximo de 8,94 logUFC.g⁻¹ em 24h de incubação, diferindo significativamente (p<0,05) do kefir na solução aquosa (8,06 logUFC.g⁻¹). O kefir em solução aquosa só atingiu seu ponto máximo de 8,84 logUFC.g⁻¹ após 48h de incubação, não diferindo significativamente (p<0,05) da bebida no mesmo intervalo de tempo (Figura 2). O kefir na bebida mista apresentou uma fase estacionária prolongada quando comparada a do kefir em solução aquosa. Esta fase teve início com 24h de incubação e continuou até às 72h de experimento. Em contrapartida, o kefir em solução aquosa apresentou queda no crescimento logo após às 48h.

Planejamento fatorial para escolha da melhor condição de encapsulamento

Os resultados da etapa de escolha da condição de encapsulamento estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Variáveis independentes do planejamento fatorial para escolha da melhor condição de encapsulamento dos 17 ensaios realizados com a bebida de umbu-cajá e acerola probiótica (90:10).

Ensaio	Umidade (%)	Aw	VM (logUFC/.g ⁻¹)
1	5,63±0,36	0,50±0,02	3,29±0,08
2	6,54±0,29	0,54±0,01	3,06±0,03
3	6,84±0,14	0,42±0,01	3,80±0,02
4	5,76±0,11	0,52±0,07	3,94±0,01
5	6,21±0,25	0,24±0,01	3,43±0,02
6	5,66±0,15	0,23±0,02	3,08±0,05
7	4,76±0,15	0,17±0,02	3,70±0,04
8	4,69±0,56	0,16±0,01	3,62±0,11
9	8,45±0,34	0,69±0,01	2,68±0,32
10	9,97±0,29	0,62±0,01	5,66 ±0,04
11	14,04±0,63	0,85±0,04	3,32±0,06
12	6,56±0,09	0,45±0,00	6,88±0,00
13	11,74±0,49	0,62±0,01	3,85±0,01
14	4,86±0,14	0,19±0,02	<1,0*
15	3,57±0,47	0,62±0,01	6,70±0,02
16	3,68±0,65	0,61±0,01	6,53±0,02
17	3,63±0,12	0,61±0,00	6,45±0,05

*<10: valores menores que 1,0 não são considerados

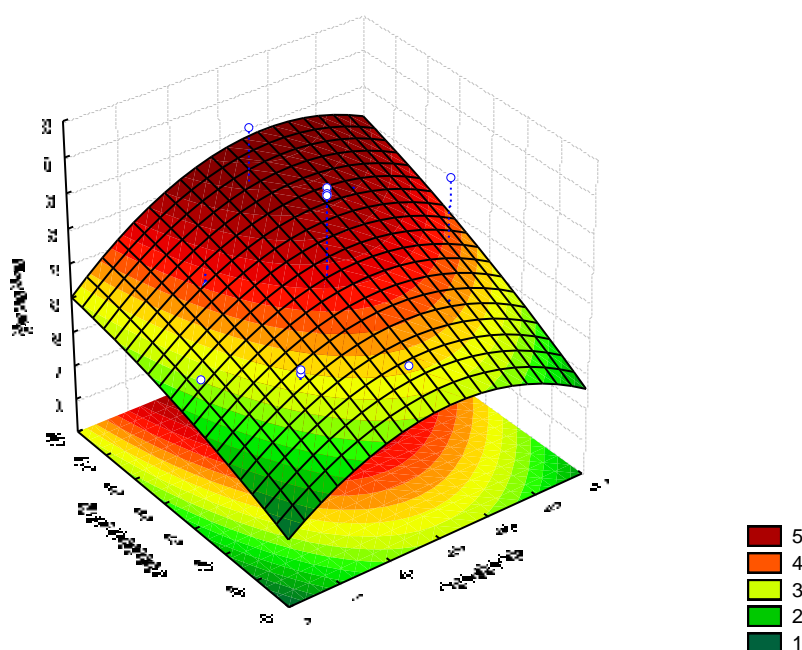
Os teores de umidade dos pós liofilizados obtidos no processo variaram entre 3,57% e 14,04% estando em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação RDC nº272/05 que recomenda, em produtos de frutas secas ou desidratadas, percentual máximo de umidade de 25% (BRASIL, 2005).

De acordo com a Tabela 6, a atividade de água dos pós obtidos variou de 0,19 a 0,85, demonstrando estabilidade microbiológica do produto, o que impede reações de fermentação por parte dos microrganismos encapsulados e contaminações por agentes patogênicos, corroborando com os resultados obtidos por Moayyedi et al. (2018). Além disso, a temperatura exerce função primordial nos teores de atividade de água e, conseqüentemente, no encapsulamento da bebida probiótica, obtendo os melhores percentuais quando submetido à temperaturas inferiores a -46°C . Todavia, temperaturas muito baixas atreladas à concentrações ineficientes dos agentes carreadores resultaram na autólise significativa dos microrganismos, passando o produto a não ser considerado probiótico, como observado no ensaio 14.

No que diz respeito à viabilidade microbiológica, o número de células viáveis variou de 0 a $6,88 \log\text{UFC.g}^{-1}$, onde foi possível verificar que a temperatura de -40°C foi determinante para proporcionar maior viabilidade microbiana, sendo os ensaios 12, 15, 16 e 17 os que obtiveram melhor desempenho.

Analisando as superfícies de resposta (Figuras 3 – a, b e c) foi possível observar que as faixas ideais das variáveis independentes para a viabilidade microbiana variam entre 13 a 22% de maltodextrina 10 DE, 8 a 13% de sacarose e -36° a -42°C de temperatura, com pontos críticos de 10% de sacarose, 17% de maltodextrina e -38°C de temperatura de liofilização. Esta projeção estatística do ponto crítico se assemelha aos ensaios (Tabela 6) que obtiveram os melhores índices de sobrevivência dos microrganismos.

(a)



(b)

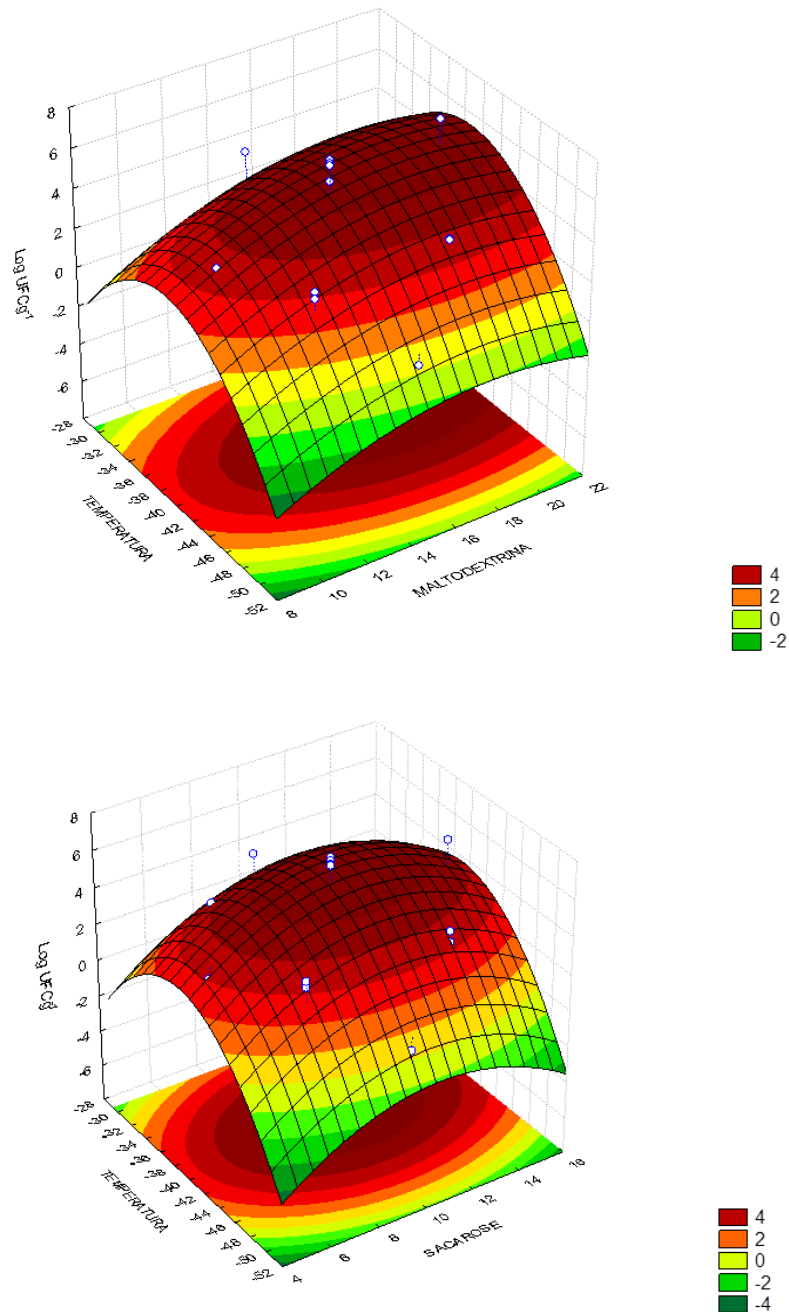


Figura 3. Superfícies de resposta para viabilidade microbiana ($\log\text{UFC.g}^{-1}$), relacionando: (a) sacarose x maltodextrina, (b) sacarose x temperatura de liofilização, (c) maltodextrina x temperatura de liofilização.

Em virtude dos resultados acima descritos, os ensaios 12 (10% sacarose, 20% maltodextrina e - 40°C) e o ponto central (10% sacarose, 15% maltodextrina e - 40°C) foram os resultados com melhor eficiência no processo de secagem, sendo selecionados para a segunda etapa do planejamento que visou analisar os índices de retenção do polifenóis totais e ácido ascórbico após a liofilização.

A Figura 4 demonstra que o ensaio 12 obteve percentuais satisfatórios de bioativos, atingindo índices de retenção de 45,83% para polifenóis totais e 96,3% para ácido ascórbico. No entanto, apesar do baixo desempenho verificado no ponto central - 65,52% de retenção para polifenóis totais e 100% de retenção para ácido ascórbico, esta foi a condição escolhida. Ademais, na Figura 4 é perceptível que o único índice com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios foi o potencial de retenção dos polifenóis totais. Desta forma os ensaios C15 a C17, pontos centrais, foram selecionados pela melhor condição de encapsulamento e será usado para caracterização do produto liofilizado.

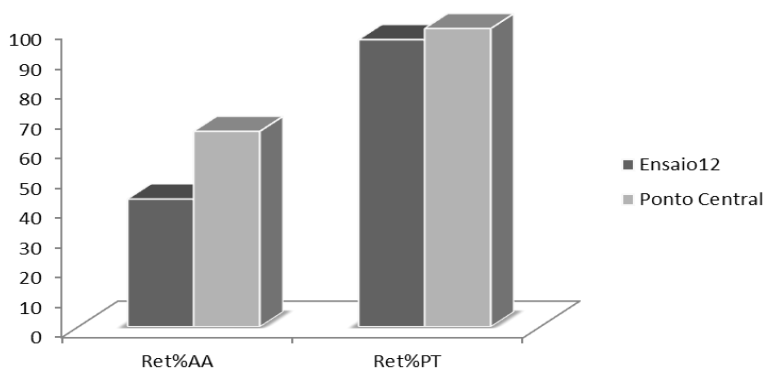


Figura 4. Gráfico da comparação entre os potenciais de retenção (Ret%) dos bioativos (ácido ascórbico - AA e polifenóis totais - PT), entre os ensaios 12 e Ponto Central (PC) da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica (BP) e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (L).

Letras iguais em dois ensaios subsequentes não diferem significativamente pelo teste *t-Student* ($p < 0,05$).

Características físico-químicas do melhor ensaio do liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico

O valor encontrado para higroscopicidade foi de $13,13\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e foram percebidas mudanças nas características físicas do pó decorrente do fenômeno *caking* (AGUILERA, DEL VALLE e KAREL, 1995).

A densidade aparente de produtos desidratados possibilita ajustar as condições de estocagem durante o processamento, embalagem e distribuição em escala industrial (BARBOSA-CANOVAS et al., 2005). No produto desenvolvido a densidade foi de $0,52\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o rendimento de 39,21% e solubilidade de 37,07%, corroborando com os valores encontrados por Rezende, Nogueira e Narain (2018).

Tabela 7. Parâmetros de determinação da cor objetiva do liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico

Amostra	L*	a*	b*	C*	H*
L	88,65	3,52	30,20	30,41	1,45
	±0,13	±0,06	±0,07	±0,07	±0,00

L: liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (9:1); C*: croma; H*: tonalidade

Considerando o ponto de vista psicométrico a cor é um dos primeiros parâmetros percebidos pelo consumidor. Conforme os resultados da tabela 7, o produto desenvolvido foi caracterizado por apresentarem valores positivos de b^* maiores que os de a^* , ou seja, cores amarela e vermelha, respectivamente, o que indica possível copigmentação de flavonóis e carotenoides com interferência cromática de antocianinas. A saturação da cor (C^*) indicam a contribuição dos valores positivos de a^* e b^* (BURIN et al, 2010) e a luminosidade (L^*) próxima a 100 que a cor é brilhante e clara. No tocante a tonalidade (H^*) a medida que se aproxima do 0° a cor tende ao vermelho. Como a contribuição de b^* foi maior do que do a^* o produto obteve uma coloração com tendência alaranjada.

CONCLUSÃO

A liofilização da bebida de umbu-cajá e acerola probiótica resultou em um produto com preservação de compostos bioativos e microrganismos probióticos. O liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (90:10) apresentou a melhor condição para o desenvolvimento do produto liofilizado. As condições ideais de encapsulamento e liofilização permitiram a elaboração de um produto em pó com retenção de ácido ascórbico e polifenóis totais presentes nas frutas utilizadas.

Por meio dos resultados obtidos foi possível mensurar a importância de pesquisas para a elaboração de alimentos que tenham caráter funcional mais amplo unindo os benefícios do consumo de probióticos e os bioativos presentes nas matérias-primas submetidas à fermentação. Neste contexto, o liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico, rico em compostos bioativos surge como uma alternativa para os consumidores que desejam algo prático e saudável e sem adição de componentes alergênicos como o leite ou a soja.

Agradecimento

À Fundação de Amparo a Ciência de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J. M.; VALLE, J.M.D.; KAREL M. Caking phenomena in amorphous food powders. **Food Science & Technology**, v. 6, p.149-155, 1995.

ALTAY, F., KARBANCIOGLU-GÜLER, F., DASKAYA-DIKMEN, C., HEPERKAN, D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International journal of food microbiology**, 167, p.44-56, 2013.

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

ANDRADE, R.A.M.S., MACIEL, M.I.S., SANTOS, A. M. P., MELO, E.A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **LWT - Food Science and Technology**, v.35, p. 354-360, 2015.

ANTUNES, A. E. C., LISERRE, A. M., COELHO, A. L. A., MENEZES, C. R., MORENO, I., YOTSUYANAGI, K., ET AL. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17.ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. Drying. In *Food Powders-Physical Properties, Processing and Functionality*, First Ed.; **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, p. 271-304, 2005.

BETORET, E.; BETORET N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003. **Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga**. Diário Oficial da União, Brasília, 4 de setembro de 2003.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. RDC nº 272 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de dezembro de 2005.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray dried amaranthus betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v.65, p.1248-1252, 2000.

CAILLÉ, S.; SAMSON, A.; WIRTH, J.; DIÉVAL, J.-B.; VIDAL, S.; CHEYNIER, V. Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. **Analytica Chimica Acta**, v. 15, p. 35-42, 2010.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A.M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, p. 420-428, 2005.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v.66. p. 572-581, 2016.

DRUSCH, S.; REGIER, M.; BRUHN, M. Recent advances in the microencapsulation of oils high in polyunsaturated fatty acids. **Novel Technologies in Food Science**, Nova Iorque, Springer, v. 7, p. 159-181, 2012.

BURIN V. M.; FALCÃO L. D.; GONZAGA L. V.; FETT R.; ROSIER J. P; BORDIGNON-LUIZ M. T. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 30 ,p. 1027-1032. 2010

DUTRA, R.L.T., DANTAS, A.M., MARQUES, D.A.,BATISTA, J.D.F., MEIRELES, B.R.L.A., CORDEIRO, A.M.T.M., MAGNANI,M., BORGES, G.S.C. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650–657, 2017.

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903-908, 2009.

GÜZEL-SEYDIM, Z., KOK-TAS, T., ERTEKIN-FILIZ, B., SEYDIM, A.C. Effect of diferente growth conditions on biomass increase in kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p.1239-1242, 2011.

MARTINS, E.M.F., RAMOS, A.M., VANZELA, E.S.L., STRINGHETA, P.C., DE OLIVEIRA PINTO, C.L., MARTINS, J.M. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, p. 764-770, 2013.

MESQUITA, A.R.C., COSTA, C.R.R.C., FRUTUOSO, J., PINHEIRO, I.O., MOTA, A., FRANCHITTI, A.A., XIMENES, E.A. Activity of metabolites produced by new strains of *Lactobacillus* in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium against multidrug-resistant bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v.1, p.345-355, 2017.

MOAYYEDI, M., ESKANDARI, M.H., RAD, A.H.E., ZIAEE, E. HOSSEIN, M., KHODAPARAST, H., GOLMAKANI, M. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, **Journal of Functional Foods**, v. 40, p.391–399, 2018.

NAMBOU, K., GAO, C., ZHOU, F., GUO, B., AI, L., WU, Z.J. A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, v. 34, p.237-246, 2014.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469– 479, 2013.

PERRICONE, M., BEVILACQUA, A., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., CORBO, M. Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages** v.1, p.95 -103.2015

RANDAZZO, W., CORONA, O., GUARCELLO R., FRANCESCA, N., GERMAN, M.A., ERTEN, H., MOSCHETTI G., SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40-51, 2016.

REZENDE, Y.R.R.S., NOGUEIRA, J.P., NARAIN, N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v. 254, p. 281–291, 2018.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., PÉREZ-JIMÉNES, J., SAURA-CALIXTO, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SHISHIR, M.R.I.S. ,CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, 49-67, 2017.

SIEUWERTS, S., DE BOK, F.A., HUGENHOLTZ, J., VAN HYLCKAMA VLIEG, J.E. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p.4997-5007, 2008.

6.2. Artigo 2 – PERFIL DOS FITOQUÍMICOS NO LIOFILIZADO DE UMBU-CAJÁ E ACEROLA PROBIÓTICO.

RESUMO

Frutas apresentam valor nutricional e composição de micronutrientes (minerais, fibras, vitaminas e compostos fitoquímicos secundários) com grande importância para a manutenção da saúde humana. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi estudar o perfil dos fitoquímicos no liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico. A bebida mista (umbu-cajá:acerola, 9:1), foi submetida à fermentação com kefir de água, adição de agentes carreadores e liofilização. Das polpas de frutas (umbu-cajá e acerola) e das bebidas mista, da probiótica e da liofilizada foram obtidos extratos etanólico, por extração líquido-líquido, para determinação de polifenóis totais, taninos totais, capacidade antioxidante (inibição do DPPH*) e perfis fenólico e de ácidos orgânicos. Métodos específicos de extração foram utilizados para quantificação de carotenóides, antocianinas e flavonóis totais. A polpa de umbu-cajá apresentou elevada concentração de carotenóides e a de acerola teores expressivos de polifenóis totais. Entre as etapas de fermentação e liofilização os polifenóis, flavonóis, taninos totais, e a capacidade antioxidante apresentaram significativo aumento. Comportamento semelhante foi observado para o ácido málico e inverso para o ácido ascórbico. Por meio do perfil fenólico foi possível quantificar rutina, ácidos siríngico e vanílico e trans-reveratrol na polpa de acerola, permanecendo apenas o flavonol e os ácidos fenólicos no liofilizado. Correlações positivas foram identificadas entre a capacidade de sequestro de radical livre e flavonóis, taninos e polifenóis totais. A análise de componentes principais extraiu 100,00% da variância total e caracterizou o liofilizado pelo ácido málico, polifenóis, flavonóis e taninos totais, e percentual de inibição do DPPH*. A técnica de secagem a frio levou ao aumento da concentração de alguns compostos bioativos e ácidos orgânicos que contribuem com ação probiótica do produto desenvolvido. Ressalta-se ainda, que a elaboração de produto liofilizado com alegação funcional pode gerar um promissor espaço no mercado de aditivos alimentícios naturais pela ação probiótica, estabilidade e facilidade de reconstituição.

Palavras-chave: frutas, liofilização, bioativos

ABSTRACT

Fruits present nutritional value and composition of micronutrients (minerals, fibers, vitamins and secondary phytochemicals) of great importance for the maintenance of human health. In this context, the objective of this research was to study the phytochemical profile of the probiotic umbu-cajá and acerola lyophilizate. The mixed drink (umbu-cajá: acerola, 9: 1) was subjected to fermentation with kefir water, addition of carrier agents and lyophilization. Liquid-liquid extraction for determination of total polyphenols, total tannins and antioxidant capacity (inhibition of DPPH *) were obtained from fruit pulps (umbu-cajá and acerola) and mixed juices, mixed probiotics and lyophilized mixed probiotics. and phenolic and organic acid profiles. Specific extraction methods were used to quantify carotenoids, anthocyanins and total flavonols. The pulp of umbu-cajá presented high concentration of carotenoids and acerola expressive of total polyphenols. Among the fermentation and lyophilization stages, polyphenols, flavonols, total tannins and antioxidant capacity showed a significant increase. Similar behavior was observed for malic acid and inverse for ascorbic acid. Through the phenolic profile, it was possible to quantify rutin, mesylic and vanillic acids and trans-veratrol in the acerola pulp, with only flavonol and phenolic acids remaining in freeze-dried mixed probiotic juice. Positive correlations were identified between the ability to sequester free radicals and total flavonols, tannins and polyphenols. Principal components analysis extracted 100.00% of the total variance and characterized lyophilized by malic acid, polyphenols, flavonols and total tannins, and percent inhibition of DPPH *. The technique of cold drying led to an increase in the concentration of some bioactive compounds and organic acids that contribute to the probiotic action of the product developed. It is also important to note that the development of lyophilized product with functional claim can generate a promising space in the market for natural food additives for probiotic action, stability and reconstitution.

Key words: fruits, freeze-drying, bioactive

INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande variedade de espécies de frutas exóticas e nativas, sub exploradas por meio do extrativismo vegetal e pequenas áreas de produção, porém com potencial para a agroindústria. Ademais, o consumo de frutas tropicais e nativas está aumentando nos mercados nacional e internacional devido ao crescente reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico devido a composição de bioativos nestes vegetais (SILVA et al., 2014; SOUZA et al., 2012). Além dos nutrientes essenciais, a maioria das frutas apresenta quantidades consideráveis de micronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e compostos fitoquímicos secundários com importância vital para a manutenção da saúde humana (BARROS, et al., 2017; SILVA et al., 2014; RUFINO et al., 2010).

A elaboração de suco de fruta com alegação funcional abre um novo leque de oportunidades para os consumidores, visto que a maioria dos alimentos funcionais existentes no mercado são de derivados lácteos (ALVES et al., 2016; CORONA, et al., 2016; PERRICONE et al., 2015; ANTUNES et al., 2013; MARTINS et al., 2013). Quando estes sucos de frutas são associados a técnicas de desidratação à frio, a exemplo da liofilização, abre-se espaço para um mercado promissor de sucos desidratados, com forma física mais estável, natural e facilmente reconstituível, que podem ser usados como corantes e/ou flavorizantes em produtos alimentícios, agregando valor nutricional (BETORET et al., 2011).

Estes sucos de frutas, quando associados ao desenvolvimento de bebidas fermentadas com kefir, podem ser percebidos pelos consumidores como uma alternativa saudável devido aos numerosos efeitos positivos dessa complexa simbiose microbiana (PUERARI et al., 2012). Além disso, substratos alternativos utilizados na produção de bebidas fermentadas com kefir possui uma forma ideal de conversão dos açúcares em ácidos orgânicos e álcool, baseado na biotecnologia, para manutenção e/ou melhoria da segurança alimentar, nutricional e sensorial (FIORDA et al., 2016).

Os sucos de duas ou mais frutas podem resultar em novos produtos com vantagens tecnológicas devido à combinação de propriedades sensoriais e nutricionais (OLUDEMI et al., 2013). Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi estudar o perfil dos fitoquímicos no liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Fermentação e liofilização da bebida mista de umbu-cajá e acerola

Por meio de dados não publicados, a bebida mista de umbu-cajá e acerola (9:1), foi submetida à fermentação com kefir por 24h a $30^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, misturada por agitação manual aos

agentes carreadores (15% maltodextrina DE 10 e 10% sacarose) e congelados por 24h a $-20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em seguida, teve início o processo de secagem em Liofilizador (virTis® SP SCIENTIFIC modelo 25L) sob pressão constante de 0,1333 Pa (alto vácuo), a -40°C por 16 horas. O produto em pó foi acondicionado em potes de polietileno descartáveis e estéreis, e mantidos sob congelamento ($-20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento de realização das análises.

Obtenção dos extratos para quantificação de polifenóis totais, taninos, atividade antioxidante e perfil fenólico e de ácidos orgânicos

Extratos etanólicos das polpas e das bebidas formuladas (bebida mista, bebida probiótica e liofilizado) foram obtidos utilizando extração sequencial. Alíquotas de 5g das amostras foi adicionado a 60mL da solução extratora (solução aquosa de etanol 60%v/v acidificada com 2%p/v de ácido cítrico) e colocadas em agitação (Agitador magnético Fisatom® modelo 752 a $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida, o extrato etanólico foi centrifugado a 4000rpm em centrífuga Cientec® (modelo CT-6000R), por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado e o volume final aferido para 100mL com a solução extratora (ANDRADE et al, 2015 – modificado: substituição da acetona por etanol e acidificação com ácido cítrico). As amostras foram extraídas em triplicata.

Quantificação de polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada, após diluição dos extratos a 0,1%v/v em água e reação com reagente fenólico Folin-Ciocalteu estabilizada com solução saturada de carbonato de sódio, por leitura da absorbância a 725 nm em espectrofotômetro Varian® 50 Bio UV/Vis, com cubeta de quartzo (percurso ótico 1 cm). Os resultados foram expressos, com base em curva analítica em mg.L^{-1} de equivalentes de ácido gálico, $y = 0,09860x + 0,10755$ ($r^2 = 0,9977$) (GIOVANELLI e BURATTI, 2009).

Quantificação de taninos condensados

A concentração de taninos totais foi determinada segundo a metodologia utilizada por, usando como reagente cromóforo solução metanólica de vanilina em meio ácido e leitura de absorbância a 500nm. Os resultados foram expressos, com base em curva analítica $y = 0,49919x + 0,06624$ ($r^2 = 0,9657$), em mg.L^{-1} de equivalentes de catequina (RODRIGUES et al, 1998).

Capacidade antioxidante

A capacidade de sequestro do DPPH* foi avaliada, conforme metodologia descrita por Nixdorf e Hermosín-Gutierrez (2010): 100 µL do extrato, diluído a 20% com metanol, foi adicionado em 2,9 mL de solução metanólica do radical DPPH* (6×10^{-5} mol.L⁻¹). A mistura reagiu por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e a absorbância foi determinada a 517 nm. O percentual de inibição foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = (A_{\text{extrato}} - A_{\text{branco extrato}}) / A_{\text{DPPH}} \times 100$$

Onde, A_{DPPH} : absorbância da solução de DPPH* e metanol

A_{extrato} : absorbância do extrato

Os resultados foram expressos em % de sequestro do radical DPPH.

Carotenoides totais (extração e quantificação)

A extração das polpas e das bebidas (BM, BP, L) foi efetuada pelo método descrito por Rodriguez-Amaya (1999), baseada na extração dos carotenoides com acetona, seguida por extração líquido-líquido com éter de petróleo. Em seguida, o extrato etéreo foi filtrado com sulfato de sódio e volume aferido em balão volumétrico de 50 mL com éter de petróleo. Foi realizada leitura da absorbância a 450nm, e a concentração calculada conforme a expressão matemática:

$$\mu\text{g equivalente de } \beta\text{-caroteno.g}^{-1} = \frac{\text{volume} \times \text{absorbância} \times 10^6}{(E_{\text{cm}}^{1\%}) \times \text{peso amostra}}$$

Onde, $E_{\text{cm}}^{1\%}$ de 2.500 - coeficiente de absorvidade

Os resultados foram expressos em µg em equivalente de β-caroteno por g da amostra.

Flavonóis e antocianinas totais (extração e quantificação)

A extração de flavonóis e antocianinas totais das polpas e das bebidas (BM, BP, L) foi efetuada pelo método descrito por Lees e Francis (1972), onde alíquotas de 2,5g da amostra de polpas e das bebidas (BM, BP, L) foi adicionada 30mL da solução extratora (mistura 85:15 de solução aquosa de etanol 95%v/v : ácido clorídrico 1,5N em água), após homogeneização manual as amostras permaneceram em repouso a 5°C e ao abrigo da luz, por 12 horas. Em seguida, foram filtradas em papel de filtro (filtração média) e o volume aferido para 50mL com a solução extratora. Após repouso de duas horas, foi determinada a absorbância do extrato a 374nm e utilizado o coeficiente de absorvidade molar de 76,6

para quantificação dos flavonóis totais, e o resultado expresso em mg por 100g de equivalente de quercetina (LEES e FRANCIS,1972).Para determinação da concentração de antocianinas totais a absorvância do extrato foi determinada a 535nm e utilizado o coeficiente de absorvidade molar de 98,2 para expressão do resultado em mg por 100g de equivalente de cianidina-3-glicosídeo (LEES e FRANCIS,1972).

Métodos Cromatográficos

a) Perfil de Ácidos Orgânicos

O extrato (item 4.6.1.a) foi diluído a 10% com água ultra-pura (Milli-q, Millipore®) e filtradas a 0,45µm, com membrana de polipropileno não estéril. Os ácidos orgânicos – oxálico, tartárico, málico, ascórbico, cítrico e succínico – foram identificados individualmente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE – com detector de absorção UV/Vis. Para quantificação foram preparadas soluções aquosas da curva analítica por meio de diluições, com água ultra-pura, de mistura contendo os seis ácidos orgânicos, conforme se segue: ácidos oxálico, tartárico e málico, 0,025 a 1,0 mg.mL⁻¹; ácido ascórbico, 0,1 a 3,0 mg.mL⁻¹ e ácidos cítrico e succínico, 0,01 a 0,2 mg.mL⁻¹. A fase móvel foi preparada com ácido fórmico, 0,12 %, e acetonitrila grau HPLC, 0,1 %, em água ultra-pura (Milli-q, Millipore®). A separação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a líquido *Ultimate 3000 Dionex*®, com coluna analítica *Acclaim*® 120 *Dionex* C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), comprimento de onda de 212 nm, fluxo da fase móvel de 0,8 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 36°C e volume de injeção de 20 µL (LIMA et al, 2010 - modificado).

b) Perfil de Fenólico

Para identificação e quantificação dos flavonóis (rutina, miricetina, quercetina e caempferol), ácidos fenólicos (gálico, siríngico, elágico, caféico, vanílico, *p*-cumárico e elágico) e estilbenos (*cis*- e *trans*-resveratrol) foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (*Ultimate 3000 Dionex*®, com coluna analítica *Acclaim*®120 *Dionex* C-18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm) fluxo da fase móvel 0,6 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 36° C, volume de injeção de 20µL e comprimentos de onda de 220, 260, 306 e 368nm, em função da maior absorvância de cada composto. A fase móvel foi constituída pela solução A (ácido fosfórico, 0,5% em água Milli-Q®:metanol (90:10)) e solução B (ácido fosfórico, 0,5% em água Milli-Q®:metanol (10:90)). Para separação dos compostos uma mistura gradiente das soluções A e B foi realizada: 0 a 25min, 0

a 20% B; 25 a 35min, 20 a 25% B; 35 a 55min, 25 a 55% B; 55 a 65min, 55 a 65% B; 65 a 75min, 65 a 80% de B e 75 a 80 min, 80 a 95% de B. A quantificação foi efetuada por meio de curva analítica ($0,05$ a $4,0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em metanol, com padronização externa e as amostras diluídas a 10% com metanol e filtradas a $0,45\mu\text{m}$ (LIMA et al., 2011; PORGALI e BYUKTUNCEL, 2012).

Análise Estatística

Todos os dados foram obtidos em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão. Foram aplicados os testes t-Student, DUNCAN e ANOVA, todos com nível de significância de $p < 0,05$, para identificar possíveis diferenças entre as médias das diferentes bebidas (BM, BP e L). A análise de componentes principais (ACP), $p < 0,05$, foi utilizada para agrupar os sucos em função das variáveis que apresentaram diferenças significativas. Correlações entre atividade antioxidante e compostos bioativos foi avaliada pela correlação de Person, sendo considerada forte para valores superiores a 0,90. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados empregando o *Statistic 7.0® software* (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas tiveram como controle os extratos das polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.

A tabela 1 apresenta os resultados dos fitoquímicos para as polpas de umbu-cajá e acerola.

Tabela 1. Composição de fitoquímicos em polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.

Polpa	CT	PT	ANTT	FLT	TT	Inib. DPPH* (%)
Umbu-cajá	5,54 ^a ±0,01	58,90 ^b ±0,85	0,15 ^b ±0,00	4,10 ^b ±6,23	0,20 ^b ±0,02	25,14
Acerola	2,81 ^b ±0,00	706,60 ^a ±6,24	4,13 ^a ±0,22	6,45 ^a ±0,09	1,42 ^a ±0,01	48,30

CT: carotenoides totais, em $\mu\text{g/g}$; PT: polifenóis totais, em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$; ANTT: antocianinas totais, em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$; FLT: flavonóis totais, em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$; TT: taninos totais, em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$; INIB DPPH*: inibição do DPPH*. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

A acerola apresenta concentração superior dos compostos estudados, exceto, carotenóides totais. Os valores de flavonóis encontrados na acerola corroboram com os

achados de Musser et al (2004) em amostras do banco ativo de Germoplasma de Pernambuco (5,9 a 22,2mg em equivalente de quercetina 100g⁻¹).

Outro ponto relevante são as altas concentrações de carotenoides presentes no umbu-cajá, sendo superior aos encontrados por Rufino et al (2010) ao analisar compostos bioativos e capacidades antioxidantes de 18 espécies tropicais não tradicionais do Brasil (2010).

As bebidas (BM, BP, L) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) para os bioativos estudados (Tabela 2). Os resultados demonstram um decréscimo significativo dos fenólicos e acréscimo de carotenoides em função da proporção das polpas na bebida mista, com consequente diminuição da atividade antioxidante.

Tabela 2. Composição de fitoquímicos da bebida mista de umbu-cajá e acerola, bebida de umbu-cajá e acerola probiótica e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico

Amostra	CT	PT	ANTT	FLT	TT	Inibição DPPH* (%)
BM	3,63 ^b ±0,01	131,10 ^c ±3,10	1,12 ^c ±0,03	3,35 ^b ±0,01	0,105 ^c ±0,010	10,32
BP	3,87 ^a ±0,01	239,01 ^b ±1,42	3,98 ^a ±4,65	3,16 ^c ±0,16	0,510 ^b ±0,010	29,72
L	3,61 ^c ±0,06	696,57 ^a ±3,97	1,90 ^b ±0,12	4,74 ^a ±0,21	2,239 ^a ±0,012	96,97

BM: Bebida mista de umbu-cajá:acerola (9:1); BP: Bebida de umbu-cajá:acerola probiótica (9:1); L: e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (9:1); CT: carotenoides totais; PT: polifenóis totais; ANTT: antocianinas totais; FLT: flavonóis totais; TT: taninos totais; INIB DPPH*: inibição do DPPH*. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

O aumento nos teores de bioativos, a exceção das antocianinas e carotenoides totais, após a liofilização ocorreu devido a diminuição do volume pela secagem, com consequente elevação na ação de sequestro de radicais livres (RUFINO, 2010; PESSUTO et al., 2009). Verificou-se que perdas significativas dos carotenoides totais e antocianinas totais durante o processo de microencapsulamento por liofilização podem ter ocorrido devido a formação de poros nas micropartículas decorrente da sublimação da água neste processo causando liberação antecipada do componente encapsulado e, consequentemente, sua degradação (REZENDE, NOGUEIRA e NAIRIN, 2018).

Fortes correlações positivas e significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre a inibição de radicais livres e flavonóis totais ($r = +0,95$) e polifenóis e taninos totais ($r = +1,00$).

Tabela 3. Resultados dos ácidos orgânicos nas polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.

Polpa	Concentração (mg.100g ⁻¹)				
	AOX	ATR	AML	AAS	ASC
Umbu-cajá	4,00 ^b ±0,01	ND	69,60 ±0,06	7,16 ^b ±0,01	ND
Acerola	4,80 ^a ±0,00	ND	ND	93,74 ^a ±0,04	ND

AOX: ácido oxálico; ATR: ácido tartárico; AML: ácido málico; AAS: L-ácido ascórbico; ASC: ácido succínico; ND: não detectado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Ao analisar os ácidos orgânicos nas polpas isoladas (Tabela 3) são evidentes concentrações significativamente ($p < 0,05$) superiores de ácido oxálico e ascórbico na acerola e presença de ácido málico no umbu-cajá.

Tabela 4. Perfil de ácidos orgânicos da bebida mista de umbu-cajá e acerola, bebida de umbu-cajá e acerola probiótica e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico

Amostra	Concentração (mg.100g ⁻¹)				
	AOX	ATR	AML	AAS	ASC
BM	ND	ND	39,80 ^b ±0,01	7,00 ^c ±0,01	ND
BMP	ND	ND	26,20 ^c ±0,01	8,61 ^a ±0,00	ND
LBMP	9,20 ±0,01	ND	121,70 ^a ±0,01	7,93 ^b ±0,01	ND

BM: Bebida mista de umbu-cajá:acerola (9:1); BP: Bebida de umbu-cajá:acerola probiótica (9:1); L e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (9:1); AOX: ácido oxálico; ATR: ácido tartárico; AML: ácido málico; AAS: ácido ascórbico; ASC: ácido succínico; ND: não detectado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Apesar da diminuição de todos os ácidos quantificados após elaboração da bebida mista (Tabelas 3 e 4), podemos observar aumento significativo ($p < 0,05$) no ácido L-ascórbico decorrente do processo de fermentação. Em decorrência do processo de liofilização, foi possível a quantificação do ácido oxálico e o aumento significativo ($< 0,05$) do ácido málico devido a concentração da bebida pelo processo de secagem indicando eficiência crioprotetora da maltodextrina e da sacarose (HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005). Entretanto, o significativo decréscimo do ácido ascórbico no liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico demonstra a instabilidade deste ácido com relação ao processo de secagem utilizado.

Na tabela 5 é possível observar a complexidade de compostos fenólicos na acerola com relação ao umbu-cajá, inclusive com concentração mais elevada de rutina.

Tabela 5. Perfil fenólico das polpas isoladas de umbu-cajá e acerola.

Polpa	Concentração (mg.100g ⁻¹)			
	Rutina	Ácido Vanílico	Ácido Siríngico	t-resveratrol
Umbu-cajá	0,030 ^b ±0,001	ND	ND	ND
Acerola	1,106 ^a ±0,002	0,045 ±0,002	0,043 ±0,001	0,021 ±0,001

ND: não detectado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

O perfil fenólico segue o comportamento dos demais compostos estudados ao apresentarem aumento significativo dos compostos, exceto rutina, após liofilização, (Tabelas 5 e 6). O estilbeno, *trans*-resveratrol, detectado na polpa de acerola, apresenta instabilidade ao método de secagem, não sendo detectado no BP (Tabela 6). Entretanto, apesar de variações significativas de concentração, a rutina é o flavonol presente em todas as etapas, corroborando Barros e colaboradores (2017) ao identificarem rutina em polpa de fruta do bioma amazônico. Estes mesmos autores reportaram presença de ácido vanílico nessas frutas.

Tabela 6. Perfil fenólico das bebidas mista de umbu-cajá e acerola, bebida probiótica e liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico

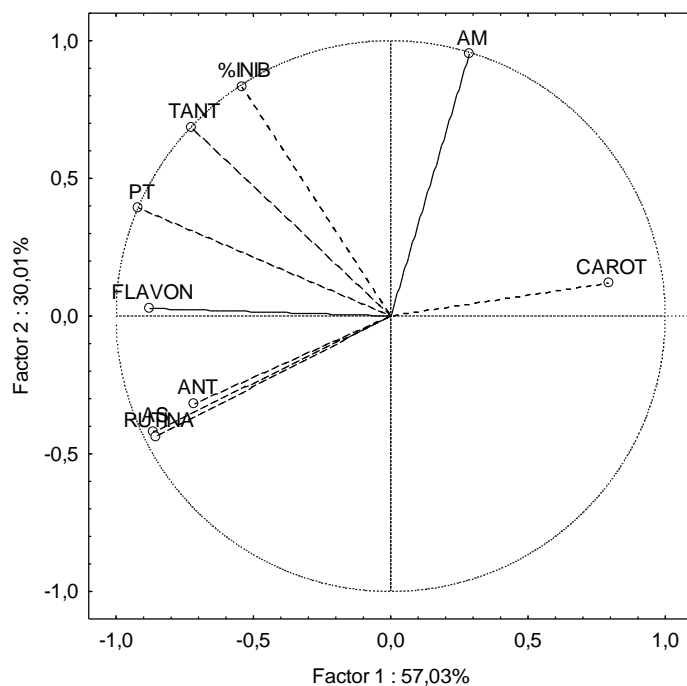
Amostra	Concentração (mg.100g ⁻¹)			
	Rutina	Ácido Vanílico	Ácido Siríngico	t-resveratrol
BM	0,041 ^a ±0,001	ND	ND	ND
BMP	0,030 ^b ±0,000	ND	ND	ND
LBMP	0,009 ^c ±0,000	0,122 ±0,002	0,008 ±0,000	ND

BM: Bebida mista de umbu-cajá:acerola (9:1); BP: Bebida de umbu-cajá:acerola probiótica (9:1); L: liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico (9:1); ND: não detectado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Análise Multivariada

A classificação dos ensaios foi realizada através da análise de componente principal – ACP (RODRIGUEZ-DELGADO et al., 2002). A separação foi obtida utilizando os compostos bioativos, atividade antioxidante e ácidos orgânicos (Figura 1).

(a)



(b)

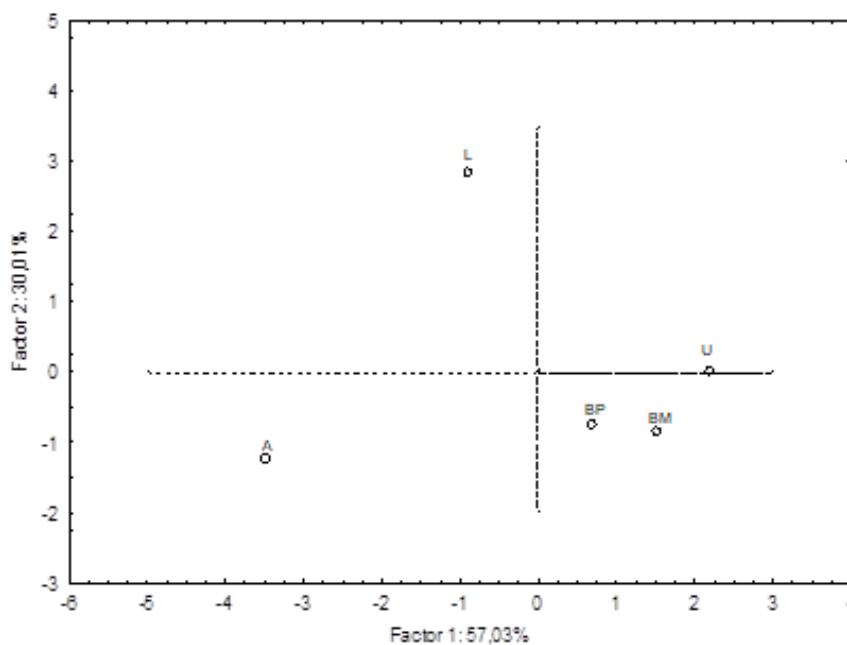


Figura 1. Contribuição das variáveis (a) - %INIB: percentual de inibição do DPPH*; TANT: taninos totais; PT: polifenóis totais; FLAVON: flavonóis totais; ANT: antocianinas; ASC: ácido succínico - e distribuição dos ensaios (b) - AC (acerola), UC (umbu-cajá), BM (bebida mista), BP (bebida probiótica) e L (liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico), no sistema de coordenadas definido pela primeira e segunda componente principal.

Analisando os *Loadings* e *Scores* foi possível observar que a CP1 (primeira componente principal) corresponde a 57,03% da variância total (Figura 1) onde a polpa de

acerola foi caracterizada pelo ácido ascórbico, rutina e polifenóis totais conforme tabelas 1 e 3. Em contrapartida, a segunda componente principal (CP2) representa 30,01% da variância total (Figura 1) e evidencia que o liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico é caracterizada pela atividade antioxidante e ácido málico.

Considerando apenas BM, BP e L foi realizada a análise de componente principal – ACP, usando como variáveis os mesmos compostos do primeiro PCA (Figura 2).

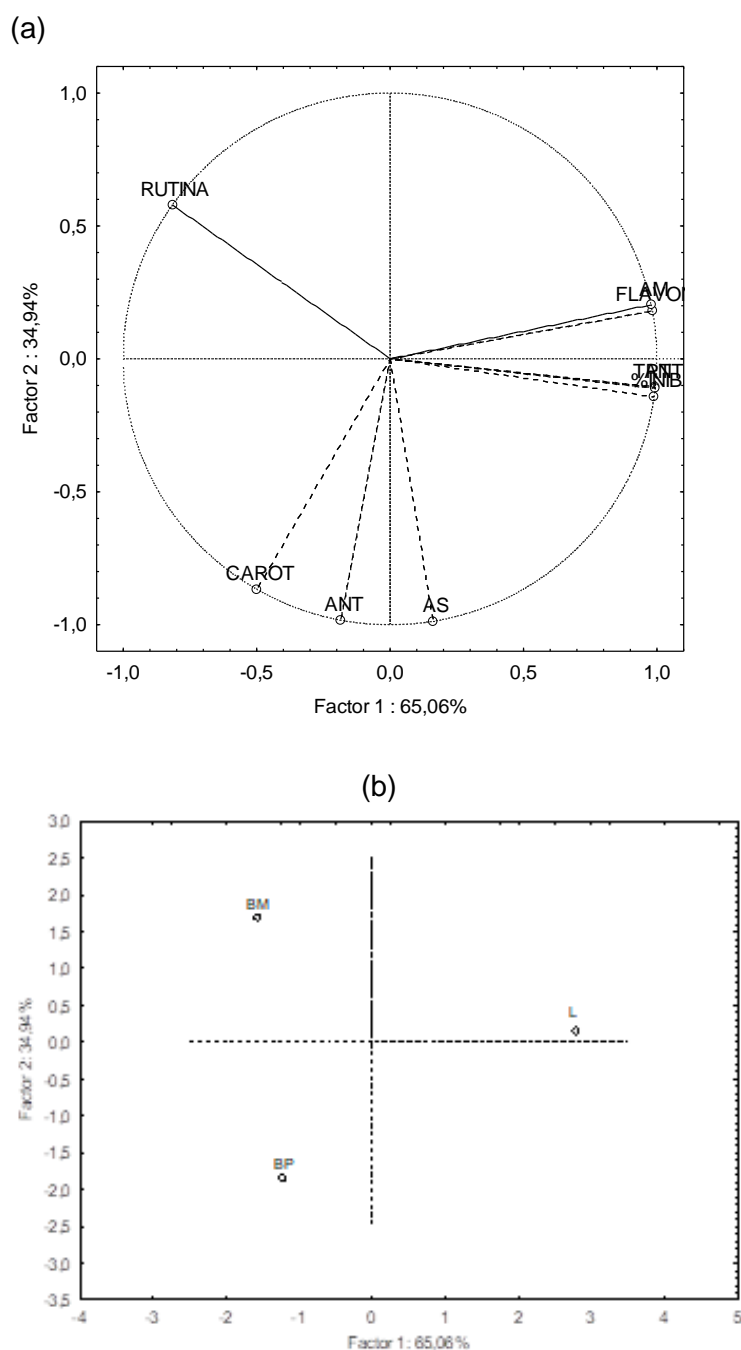


Figura 2. Contribuição das variáveis (a) - %INIB: percentual de inibição do DPPH*; TANT: taninos totais; PT: polifenóis totais; FLAVON: flavonóis totais; ANT: antocianinas; AS: ácido succínico - e distribuição dos ensaios (b) - BM (bebida mista), BP (bebida probiótica) e L (liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico), no sistema de coordenadas definido pela primeira e segunda componente principal.

Analisando os *Loadings* e *Scores* foi possível observar que a CP1 (primeira componente principal) corresponde a 65,06% da variância total (Figura 2), caracterizando o liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico pelo ácido málico, polifenóis totais, flavonóis, taninos totais e percentual de inibição do DPPH*, conforme tabelas 2 e 4. Ainda em CP1 os bebida mista e bebida probiótica são caracterizados pela rutina e ácido cítrico. A segunda componente principal (CP2) representa 34,94% da variância total (Figura 2) e evidencia que o bebida probiótica é caracterizado pelo ácido ascórbico e antocianinas totais corroborando os dados das tabelas 2 e 4.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que houve um aumento da concentração de alguns compostos bioativos e ácidos orgânicos no liofilizado de umbu-cajá e acerola probiótico, que contribuem com a capacidade antioxidante deste produto além de ser uma alternativa para a indústria de alimentos investir em algo prático, saudável, sem adição de componentes alergênicos e que pode gerar benefícios à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17.ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.

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

ANDRADE, R.A.M.S., MACIEL, M.I.S., SANTOS, A. M. P., MELO, E.A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **LWT - Food Science and Technology**, v.35, p. 354-360, 2015.

ANTUNES, A. E. C., LISERRE, A. M., COELHO, A. L. A., MENEZES, C. R., MORENO, I., YOTSUYANAGI, K., ET AL. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013.

BARROS, R.G.C., ANDRADE, J.K.S., DENADAI, M., NUNES, M.L., NARAIN, N.. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. **Food Research International** 102, p. 84–92, 2017.

BETORET, E.; BETORET N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v.66. p. 572-581, 2016.

FIORDA, F.A.; PEREIRA, G.V.M; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEDEIROS, A.P.; AKSHIT, S.K. ;SOCCOL, C.R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT - Food Science and Technology** v.68, p.690-697, 2016.

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903-908, 2009.

HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**,v.46, p.205-229, 2003.

LEES, D. H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigments analyses in cranberries. **HortScience**, v. 7. N. 1, p. 83-84, 1972.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A. R. P. ; NONETE B. GUERRA ; PEREIRA, G.E. ; LIMA, T. L. DE A. ; ROCHA, H. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 1186-1189, 2010.

MARTINS, E.M.F., RAMOS, A.M., VANZELA, E.S.L., STRINGHETA, P.C., DE OLIVEIRA PINTO, C.L., MARTINS, J.M. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, p. 764-770, 2013.

MUSSER, R. S. LEMOS,M.A.,LIMA,V.L.A.G.,MÉLO,E.A., LEDERMAN, I.E., SANTOS, V.F. Características físico-químicas de acerola do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, v. 4, p. 556-561, 2004.

NIXDORF, S. L. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 208-215, 2010.

OLUDEMI, F.O.; AKANBI, C. T. Chemical, antioxidant and sensory properties of tomato-watermelon-pineapple blends, and changes in their total antioxidant capacity during storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v.48, p.1416– 1425, 2013.

RANDAZZO, W., CORONA, O., GUARCELLO R., FRANCESCA, N., GERMAN, M.A., ERTEN, H., MOSCHETTI G., SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, 54, p. 40-51, 2016.

REZENDE, Y.R.R.S., NOGUEIRA, J.P., NARAIN, N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v. 254, p. 281–291, 2018.

RODRIGUES, W. ALVARENGA, M. MAGALHÃES, P.C.BESTECHINI, A.G. TOSELI, G.A. Assays to detect tannins in sorghum evaluating chicks performance and digestibility of dry matter. **Ciência e Agrotecnologia**.v.22, p.540-550,1998.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoids analysis in food**. ILSI Press: Washington, 1999.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., PÉREZ-JIMÉNES, J., SAURA-CALIXTO, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SILVA, L. M. R., FIGUEIREDO, E. A. T., RICARDO, N. M. P. S., VIEIRA, I. G. P., FIGUEIREDO, R. W.,BRASIL, I. M. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.143, p.398–404, 2014.

SOUZA, V.R., PEREIRA, P.A., QUEIROZ, F., BORGES, S.V., CARNEIRO, J.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, 134, p. 381-386, 2012.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**.v. 29, p. 897-910, 2005.

PERRICONE, M., BEVILACQUA, A., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., CORBO, M. Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages** v.1, p.95 -103.2015

PESSUTO, M.B., Costa, I.C., Souza, A.B., Nicoli, F.M., Mello, J.C.P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, 32, p. 412-416, 2009.

PORGALI, E.BÜYÜKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*. v.45, p.145-154, 2012.

PUERARI, C., MAGALHÃES, K. T., & SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, 48, 634-640, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio dos resultados desta pesquisa foi possível verificar que diferentes faixas de temperatura e distintas proporções de agentes crioprotetores no processo de liofilização interferem significativamente na viabilidade microbiológica das bebidas probióticas.

Além disso, foi verificada uma tendência à adaptação do kefir ao umbu-cajá em comparação a acerola sendo necessário estudos futuros sobre a composição físico-química dessas frutas para melhor entendimento deste comportamento microbiológico.

Estudos futuros sobre a eficiência dos agentes encapsulantes na retenção dos compostos bioativos durante os processos de liofilização necessitam ser desenvolvidos para potencializar o caráter funcional de bebidas probióticas liofilizadas.

Desta forma, o avanço nas pesquisas, no que diz respeito à fermentação de sucos de frutas brasileiras utilizando kefir é necessário para traçar perfis bioativos e sensoriais que corroborem para uma melhor eficiência nos métodos de secagem a frio e aceitação dos produtos elaborados.