



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIA THEREZA CARLOS FERNANDES

**LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus reuteri* LR92 COM  
ADIÇÃO DE EXTRATO DE JUÇARA E PRODUÇÃO DE  
REUTERINA *in situ***

---

Londrina  
2017

MARIA THEREZA CARLOS FERNANDES

**LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus reuteri* LR92 COM  
ADIÇÃO DE EXTRATO DE JUÇARA E PRODUÇÃO DE  
REUTERINA *in situ***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia.  
Co-orientadora: Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Fernandes, Maria Thereza Carlos .

Leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 com adição de extrato de juçara e produção de reuterina in situ. / Maria Thereza Carlos Fernandes. - Londrina, 2017.  
116 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Coorientador: Karla Bigetti Guergoletto .

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. leite fermentado - Tese. 2. juçara - Tese. 3. reuterina - Tese. 4. antioxidantes - Tese.  
I. Garcia, Sandra . II. Guergoletto , Karla Bigetti . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

MARIA THEREZA CARLOS FERNANDES

**LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus reuteri* LR92 COM ADIÇÃO  
DE EXTRATO DE JUÇARA E PRODUÇÃO DE REUTERINA *in situ***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia.  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Grasielle Scaramal Madrona  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Profa. Dra. Cinthia Hoch Batista de Souza  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 12 de abril de 2017.

Aos meus pais Luiz e Lucia  
por estarem sempre ao meu lado incentivando  
e apoiando meus sonhos.  
Ao meu irmão Guilherme e ao Milton  
pelo amor, carinho e por  
acreditarem em mim

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ser a luz que me ilumina em todos os momentos nessa caminhada e por mais essa etapa realizada.

À professora Dra. Sandra Garcia, pela oportunidade de realizar este projeto, pelos ensinamentos que proporcionaram meu desenvolvimento profissional e pessoal. Pelo exemplo, competência profissional, caráter e generosidade meu imenso respeito e admiração.

A minha co-orientadora professora Dra Karla Bigetti Guergoletto, pelas orientações, paciência para os problemas que foram aparecendo ao longo da execução dos experimentos e amizade. Obrigada por toda ajuda sempre.

Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição para ensinamentos e dúvidas.

Aos docentes e profissionais do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina por compartilharem seus ensinamentos e estarem sempre à disposição e fornecerem condições para a realização deste estudo.

Aos colegas de laboratório e do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos e aos amigos que o mestrado me presenteou, que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis e nas alegrias, me auxiliando na teoria e na prática dos experimentos: Marcela Terhaag, Fernanda Farinazzo, Carolina Saori, Marsilvio Lima de Moraes Filho, Marli Busanello, Alessandra Bosso e Fabio Rodrigues. Sem vocês essa jornada seria muito mais difícil.

Agradeço aos meus pais, Lucia e Luiz, que sempre me deram apoio incondicional, muito amor e sabedoria. Ao meu irmão Guilherme por todo seu incentivo e nossas conversas. Ao meu namorado Milton por estar sempre ao meu lado apoiando, ajudando nos momentos difíceis e acompanhando nos experimentos de finais de semana e feriados. As minhas amigas Ane, Carolina, Luiza e Keilla por toda amizade, apoio nos bons e maus momentos, muito obrigada por tudo.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

FERNANDES, Maria Thereza Carlos. **Leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 com adição de extrato de juçara e produção de reuterina *in situ***. 2017. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

## RESUMO

Leite fermentado é o produto obtido através da fermentação do leite por bactérias ácido-láticas, dentre estas o *Lactobacillus reuteri* o qual é um lactobacilo heterofermentativo, amplamente utilizado em suplementos alimentares devido às ações que incluem a produção de antimicrobianos como a reuterina. A juçara (*Euterpe edulis*), é uma palmeira cujos frutos possuem elevados valores energéticos e nutricionais, além de promissora fonte de antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi produzir leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 com e sem adição de extrato de juçara e verificar a produção de reuterina *in situ*. Para produção, o leite foi fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92, durante 12 horas em anaerobiose a 37 °C, e ao final deste período foi adicionado extrato de juçara. Após a fermentação, para a caracterização dos produtos, realizou-se a quantificação da reuterina e o poder de inibição frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, simulação gastrointestinal e análise sensorial. Durante o armazenamento (30 dias a 4 °C) foram avaliados: pH, viabilidade celular, acidez titulável, composição centesimal, produção de ácidos orgânicos e açúcares por HPLC, capacidade antioxidante e se estes exercem efeito protetor de células do *Lactobacillus reuteri* na indução ao estresse oxidativo. A quantificação da reuterina foi de  $0,32 \pm 0,02$  mM para o extrato bruto e  $0,43 \pm 0,01$  mM para o extrato 2,5 vezes concentrado, concentração que apresentou inibição para as cepas de *Staphylococcus aureus*. Na simulação gastrointestinal, após 6 horas, a população foi de 2,47 log de UFC/mL. O pH (4,5), acidez titulável (1,1 % de ácido láctico) e composição centesimal apresentaram-se de acordo com a literatura. A contagem inicial de 7 log UFC/ mL chegou a 6 log UFC/mL (30 dias). A concentração de açúcares determinada por HPLC foi de  $3,53 \pm 0,54$ ,  $4,60 \pm 0,41$ ,  $0,79 \pm 0,25$  e  $0,04 \pm 0,00$  mg/mL para sacarose, lactose, galactose e frutose respectivamente. A quantificação de ácido láctico foi de 8,66 mg/mL ao término do armazenamento. Em relação a resistência ao estresse oxidativo e atividade antioxidante o fermentado com extrato de juçara apresentou maiores respostas em relação ao leite fermentado sem a adição do extrato durante 30 dias analisados. O produto obteve nota 7 para aceitação global na análise sensorial, semelhante aos valores encontrados para leites fermentados já comercializados. Portanto a utilização do extrato dos frutos de juçara para a produção de leite fermentado pode ser uma alternativa para contribuir com a preservação da espécie, assim como agregar valor ao produto final, sendo que a produção de reuterina *in situ* contribuiria para conservação do produto.

**Palavras-chave:** Funcional. Probiótico. Antimicrobianos. *Euterpe edulis*. Glicerol.

**FERNANDES, Maria Thereza Carlos. Fermented milk by *Lactobacillus reuteri* with addition of juçara extract and production of reuterin *in situ*. 2017. 116 p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Londrina State University, Londrina, 2017.**

## **ABSTRACT**

Fermented milk is the product obtained by fermentation of milk by lactic acid bacteria, among them *Lactobacillus reuteri* which is a heterofermentative lactobacillus, widely used in food supplements due to the actions that make up the production of antimicrobials as a reuterin. The juçara (*Euterpe edulis*), is a palm tree whose berry fruits have high energy and nutritional values, as well as a promising source of antioxidants. The aim of this study was to compare milk fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92 with and without juçara extract and to verify the production of reuterin *in situ*. For the production, the milk was fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92, for 12 hours in anaerobiosis at 37 ° C, and at the end of this period juçara extract was added. After fermentation, the quantification of reuterin, its inhibition capacity against strains of *Staphylococcus aureus*, gastrointestinal simulation and sensorial evaluation were performed for the characterization of the products. During storage (30 days at 4 ° C) pH, cell viability, titratable acidity, proximal composition, production of organic acids and sugars by HPLC, antioxidant capacity and protective extract effect over *L. reuteri* cells on induction to oxidative stress. The reuterin quantification was  $0.32 \pm 0.02$  mM for the crude extract and  $0.43 \pm 0.01$  mM for the 2.5-fold concentrate extract, concentration that showed inhibition for strains of *Staphylococcus aureus*. In the gastrointestinal simulation, after 6 hours, a population of 2.47 log CFU / mL was observed. The pH (4.5), titratable acidity (1.1% lactic acid) and proximal composition were reported according to a literature. The initial count of 7 log CFU / mL reached 6 log CFU / mL (30 days). The sugars concentrations were  $3.53 \pm 0.54$ ,  $4.60 \pm 0.41$ ,  $0.79 \pm 0.25$  and  $0.04 \pm 0.00$  mg / mL for sucrose, lactose, galactose and fructose respectively. Quantification of lactic acid was 8.66 mg / mL at the end of storage. In relation to oxidative stress resistance and antioxidant activity the fermented product with juçara extract presented a higher response in relation to the fermented milk without the addition of extract during 30 days analyzed. The product obtained note 7 for global acceptance in the sensory evaluation, for the values found for already commercialized fermented milk. Therefore, it can be concluded that the addition of juçara fruit for fermented milk production can be considered as an alternative for the conservation of the species, as well as for the valorization of the final product.

**Keywords:** Functional. Probiotic. Antimicrobials. *Euterpe edulis*. Glycerol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1</b> - Formas de HPA. 25	
<b>Figura 2</b> - Biossíntese da reuterina e 1,3 propanodiol. ....	27
<b>Figura 3</b> - Estrutura do Glicerol.....	28
<b>Figura 4</b> - Reação de transesterificação. ....	28
<b>Figura 5</b> - Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH.....	34

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1</b> - Crescimento de <i>L. reuteri</i> e valores de pH durante 24 horas de fermentação em leite. ....	54
<b>Figura 2</b> Halos de inibição de extrato de Leite fermentado (com adição de extrato de juçara - LFJ) na concentração 2,5 vezes para <i>S. aureus</i> ATCC 29231 e <i>S. aureus</i> N315. ....	56
<b>Figura 3</b> - Consumo de açúcares por <i>L. reuteri</i> em 24 horas de fermentação em leite. ....	58
<b>Figura 4</b> - Produção de ácidos orgânicos durante 24 horas de fermentação de leite por <i>L. reuteri</i> .....	60
<b>Figura 5</b> - Ácidos orgânicos durante o armazenamento de leite fermentado com extrato de juçara (LFJ) e Leite fermentado (LF). ....	61
<b>Figura 6</b> - Sobrevivência celular (log de UFC/mL) de <i>L. reuteri</i> em leite fermentado e leite fermentado com extrato de juçara após cada etapa da simulação gastrointestinal. ....	63
<b>Figura 7</b> - Avaliação dos atributos sensoriais (escala de 1-9) de leite fermentado com adição de extrato de juçara. ....	64

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1</b> - Concentração de <i>L. reuteri</i> em presença de 1,5 mM de peróxido de hidrogênio, após incubação de 6 horas.....	81
<b>Figura 2</b> - Concentração de <i>L. reuteri</i> em presença de radical hidroxila gerado pela presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio, após período incubação de 6 horas. ....	83

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Contagem de *L. reuteri* durante 30 dias de armazenamento a 4°C em leite fermentado com extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF).....55
- Tabela 2** - Determinação de açúcares em leite fermentado com *L. reuteri* com (LFJ) e sem adição de extrato de juçara (LF) LF e LFJ em 30 dias de armazenamento (4°C).....58

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1** - Composição centesimal de leite fermentado (LF) e leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) durante 30 dias de armazenamento (4°C) em 100g.....76
- Tabela 2** - Parâmetros L\*, a\* e b\* para o Leite Fermentado (LF) e Leite Fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) durante o armazenamento por 30 dias à 4°C .....77
- Tabela 3** - Fenólicos e atividade antioxidante do leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF) durante 30 dias de armazenamento a 4°C .....79
- Tabela 4** - Resistência de *L. reuteri in vitro* ao peróxido de hidrogênio em leite fermentado com extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF)..... 82
- Tabela 5** - Resistência ao ânion superóxido em leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF) durante 30 dias de armazenamento à 4°C .....83
- Tabela 6** - Resistência do *L. reuteri* ao radical hidroxila em leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF) durante 30 dias de armazenamento a 4°C .....85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
ABTS+●	Radical do cátion ABTS
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	Componente amarelo-azul
DPPH●	Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ERRO	espécies reativas de oxigênio.
FRAP	Poder de redução do ion férrico.
L*	Luminosidade
LF	Leite Fermentado
LFJ	Leite Fermentado com adição de extrato de juçara
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REFERÊNCIAS .....	18
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.1 Alimentos funcionais.....	20
1.2 Leite fermentado .....	21
1.2.1 Leite fermentado probiótico. ....	22
1.3 <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	23
1.4 Reuterina (3-HPA) .....	24
1.5 Glicerol.....	27
1.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
1.7 Juçara ( <i>Euterpe edulis Martius</i> ) .....	30
1.8 Antioxidantes .....	33
11 REFERÊNCIAS .....	35
Capítulo 2. Elaboração de leite fermentado por <i>Lactobacillus reuteri</i> LR92 com adição de extrato de juçara e determinação da reuterina <i>in situ</i> . ....	44
Resumo.....	44
1 Introdução.....	45
2. Material e Métodos .....	47
2.1. Microrganismos .....	47
2.2 Extrato de juçara.....	48
2.3 Leite fermentado .....	48
2.5 Determinação do pH e acidez titulável.....	49
2.6 Determinação da reuterina .....	49
2.7 Ensaios de inibição .....	50
2.8 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos .....	51
2.8.1 Extração e preparo das amostras .....	51

2.8.2 Determinação de açúcares.....	51
2.8.3 Determinação de ácidos orgânicos .....	51
2.9 Simulação gástrica.....	52
2.10 Análise Sensorial .....	53
2.11 Análise Estatística.....	53
3 Resultados e Discussão .....	54
3.1 Contagem, pH e acidez titulável .....	54
3.2 Ensaio de Inibição e quantificação da reuterina .....	56
3.3 Determinação de açúcares.....	57
3.4 Determinação de ácidos orgânicos.....	59
3.5 Simulação Gástrica .....	61
3.6. Análise sensorial.....	63
4. Conclusão.....	65
Resumo.....	69
2. Materiais e métodos.....	71
2.1 Microrganismo .....	71
2.2 Extrato de juçara .....	71
2.3 Leite fermentado .....	72
2.4 Avaliação da composição centesimal .....	72
2.5 Medida de cor .....	72
2.6 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	73
2.6.1 Extração da amostra para determinação da capacidade antioxidante .....	73
2.6.2 Determinação de compostos fenólicos totais .....	73
2.6.3 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH· .....	73
2.6.4 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radical Livre .....	74
ABTS·+.....	74
2.6.5 Capacidade Antioxidante: Capacidade de redução do ferro (FRAP) .....	74
2.7 Resistência às espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	74
2.7.1. Resistência ao peróxido de hidrogênio.....	75
2.7.2 Resistência ao ânion superóxido.....	75
2.8 Análise Estatística.....	76
3. Resultados e discussão .....	76

3.1 Composição Centesimal .....	76
3.2 Cor .....	77
3.2 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	78
3.3 Testes de resistência às espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	80
3.3.1 Resistência ao peróxido de hidrogênio .....	80
3.3.3 Resistência ao radical hidroxila .....	83
4. Conclusão .....	85
REFERÊNCIAS .....	86
CONCLUSÃO GERAL .....	91
ANEXOS .....	92

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os produtos em destaque no mercado alimentício, um segmento que tem atraído a atenção de consumidores é o de alimentos funcionais com expectativas de crescimento de 14,8 % até 2018, movimentando cerca de US\$ 30 milhões (EUROMONITOR, 2015). Alimentos funcionais são alimentos naturais ou processados que além de seus componentes nutricionais contém substâncias adicionais que favorecem a saúde, e o estado físico e mental de quem os consome (ROBERFROID, 2000). Os diversos tipos de leite fermentado possuem papel de destaque no segmento dos alimentos funcionais, pois são os produtos de escolha pela indústria alimentícia para a adição de culturas probióticas e ingredientes prebióticos e, desta forma, são considerados comercialmente os principais alimentos que contém estes compostos (SANCHEZ et al., 2009).

Em produtos lácteos são comumente adicionados sabores derivados de frutas, como morango, ameixa ou pêsego (SANTOS, 2012). Entretanto, o Brasil oferece uma variedade de frutas com sabores e aromas diferenciados, as quais podem ser uma alternativa de adição na fabricação do leite fermentado. Entre os vegetais com potencial de aproveitamento está o fruto da palmeira juçara.

A juçara (*Euterpe edulis*), é uma palmeira que pertence à família *Arecaceae* e ao gênero *Euterpe*. Nativas da Floresta Atlântica do Brasil, conhecida popularmente como juçara, jiçara ou palmitero contém aproximadamente 7 espécies distribuídas nos trópicos ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até a Bahia. Semelhante nutricionalmente ao fruto do açazeiro (*E. oleracea*), a juçara apresenta quantidades superiores de antocianinas (IADEROZA, 1992). Estas que por conta de seu poder antioxidante apresentam grande importância na dieta humana auxiliando na prevenção ou retardamento de doenças cardiovasculares; do câncer e doenças neurodegenerativas; atuando contra os radicais livres; com propriedades farmacológicas utilizadas para fins terapêuticos (BOBBIO, 1995).

Devido à extração clandestina do palmito, a palmeira juçara foi considerada em 2012 pelo Centro Nacional de Conservação da Flora uma espécie vulnerável, esta classificação é para espécies que enfrentam um risco de extinção elevado na natureza (CNCFLORA, 2012). Agregar valores aos produtos dos frutos, incentiva agricultores e comunidades tradicionais a manter matas, quintais e diversos tipos de agroecossistemas com palmeiras reprodutivas (COSSIO, 2009).

Do grupo das bactérias ácido-lácticas heterofermentativas o *Lactobacillus reuteri* possui o certificado de “presunção qualificada de segurança” (QPS) pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia. Possui ação probiótica que é atribuída à combinação de diversos mecanismos, incluindo-se a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e capacidade de algumas linhagens de produzirem reuterina ( $\beta$ hidroxipropionaldeído;  $\beta$ -HPA) durante o metabolismo anaeróbico de glicerol (LANGA, 2013).

A reuterina ou hidroxipropionaldeído (3-HPA) é um antimicrobiano que inibe o crescimento de muitos gêneros de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tais como *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e também leveduras, bolores e protozoários, (TALARICO e DOBROGOSZ 1989). Devido ao amplo espectro de ação, tem sido proposta a sua utilização para melhorar a segurança e a qualidade de alimentos, reduzindo a adição de conservantes químicos (AXELSSON et al., 1989; VOLLENWEIDER et al., 2003).

Deste modo, a crescente procura por produtos lácteos, a expansão do segmento de alimentos com valores nutritivos e funcionais, além da necessidade de inovação do mercado com a introdução de novos produtos conduzem a alternativas que possam contribuir com a maior utilização do fruto da palmeira juçara de maneira sustentável e contribuir com a preservação desta espécie além de agregar valor ao produto final.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Produzir leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 (Sacco DSM 26866) com e sem a adição de extrato de juçara e avaliar a produção de reuterina *in situ* e o potencial antioxidante do produto desenvolvido.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Produzir leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 (Sacco DSM 26866) com adição e sem de extrato de juçara;
- ✓ Determinar a composição centesimal, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, resistência ao estresse oxidativo do leite fermentado com e sem adição de extrato de juçara, logo após a produção e durante o armazenamento à 4 °C nos tempos 15 e 30 dias;
- ✓ Verificar e determinar a produção de reuterina pelo *L. reuteri* durante a fermentação do leite;
- ✓ Determinar a inibição de *Staphylococcus aureus* pela reuterina produzida no produto;
- ✓ Determinar a aceitabilidade do produto desenvolvido através de análise sensorial.

### 3 REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L.T., CHUNG, T.C., DOBROGOSZ, W.J., LINDGREN, S.E., Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology Health Disease**. 2, p. 131-136. 1989.
- CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora 2012. Disponível em: <http://www.cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe%20edulis>. Acessado em 10 de maio de 2016.
- COSSIO, R. R. et al. Elaboração do Projeto Piloto para o Manejo Sustentável dos Frutos da Palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) no Rio Grande do Sul. **Cadernos de Agroecologia**, v. 4, p. 2940-2943, 2009.
- COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. 1 ed. Rio de Janeiro: Rubio. p.536, 2010
- IADEROZA, M. et al. Anthocyanins from fruits of açai (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Tropical Science** v. 32, p. 41-46, 1992.
- LANGA, S., J M. et al. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products, **Food Control** v. 33 p. 1-5, 2013.
- ROBERFROID, MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 71(6), p. 1669S-1664S, 2000.
- SANCHEZ, B. et al. Probiotic fermented milks: present and future. Int. **Journal Dairy Technology**, v. 62, p. 1-10, 2009.
- SANTOS, G. et al. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do leite fermentado probiótico desnatado adicionado de jenipapo desidratado osmoticamente. **Revista Instituto Latico “Cândido Tostes”**, v.388, p. 61-67, 2012.
- TALARICO, T. L., W. J. DOBROGOSZ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v.33 p. 674-679. 1989.
- VOLLENWEIDER, S., GRASSI, G., KONIG, I., PUHAN, Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 3287-3293, 2003.

A dissertação apresenta-se na forma de 3 capítulos distintos, descritos abaixo, seguidos da conclusão geral e anexos:

1– Revisão Bibliográfica: Alimentos funcionais, Leite fermentado, Leite fermentado probiótico, *Lactobacillus reuteri*, Reuterina, Glicerol, *Staphylococcus aureus*, Juçara, Antioxidantes.

2– Artigo: Capítulo 2. Elaboração de leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 com adição de extrato de juçara e determinação da reuterina *in situ*. Capítulo escrito conforme normas da revista LWT (anexo 5)

3 – Artigo: Capítulo 3: Efeito do armazenamento na atividade antioxidante e sobrevivência ao estresse oxidativo de *Lactobacillus reuteri* LR92 em leite fermentado com extrato de juçara.

Capítulo escrito conforme normas da ABNT

## **CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Alimentos funcionais**

O termo “alimentos funcionais” surgiu no Japão em meados dos anos 80. Descrevendo alimentos, que além de suas funções nutricionais básicas, apresentavam benefícios fisiológicos ou reduziam a incidência de doenças crônicas (COSTA; ROSA, 2016).

Os alimentos funcionais podem ser divididos em três classes (alimentos convencionais, modificados e sintetizados). Os alimentos convencionais contêm compostos bioativos naturais com propriedades funcionais tais como: vitaminas antioxidantes na laranja, prebióticos e probióticos. Alimentos modificados, adquirem compostos bioativos através de métodos de fortificação e enriquecimento (exemplo: ômega-3). E alimentos sintetizados, são os que contêm hidratos de carbono não digeríveis, que fornecem benefícios prebióticos, como os oligossacarídeos ou amido resistente (CROWE; FRANCIS, 2013). Prebióticos são componentes nutricionais não digeríveis que estimulam o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon, já os probióticos são os microrganismos vivos, estimulados por prebióticos, que trazem benefícios a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

No Brasil somente em 1999, entrou em vigor a Resolução nº16/99 (BRASIL, 1999), das diretrizes básicas para análise e comprovação de alegação de propriedade funcional e, ou, de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (MORAES; COLLA, 2006). Segundo a Anvisa (BRASIL, 2016) podem ter alegação de alimentos com propriedades funcionais aqueles que estão relacionados ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente (ex. fibras) ou não nutriente (ex. licopeno) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo. Estes alimentos podem atuar na conservação dos níveis saudáveis de triglicerídeos, na proteção celular contra os radicais livres, na menor absorção do colesterol, no funcionamento do intestino e regularização da microbiota intestinal (BRASIL, 2016).

O consumo de alimentos funcionais está em ascensão. Segundo a consultoria Euromonitor International (2015), o segmento de alimentos e bebidas com apelo à saúde e ao bem-estar movimentou quase R\$ 80 bilhões no Brasil no ano de 2014, com a previsão de movimentar R\$ 108,5 bilhões até 2018.

As principais razões para o crescimento deste mercado estão relacionadas às maiores expectativas de vida e as tendências de problemas de saúde atuais tais como: obesidade, doenças cardíacas, câncer e osteoporose. Problemas que em sua maioria poderiam ser minimizados e até mesmo evitados através de uma dieta correta associadas a hábitos de vida saudáveis (GUIMARÃES; OLIVEIRA, 2014)

Desta forma há um grande número de pesquisas voltadas para a identificação das propriedades destes alimentos e potenciais aplicações de novas substâncias funcionais (WILDMAN, 2006), comprovando a afirmação de Arai e colaboradores (2001) de que o desenvolvimento da ciência de alimentos no futuro próximo provavelmente dependeria do avanço da ciência alimentar funcional.

## **1.2 Leite fermentado**

A origem dos leites fermentados remonta à antiguidade, em que tribos nômades utilizavam odres e recipientes de cerâmicas ou peles de animais para conservar o leite, que fermentava graças à microbiota láctica adquirida acidentalmente na ordenha. Este processo transformava o leite em um produto sensorialmente mais atrativo além de prolongar sua vida útil. São diversos os tipos de leite fermentado no mundo, e que foram evoluindo de maneira similar. Elaborados a princípio por artesões, os microbiologistas e tecnólogos posteriormente conseguiram reproduzir os processos, isolar e selecionar os microrganismos que melhor fermentavam o leite, produzindo as características sensoriais desejadas, e finalmente, culminando no setor industrial que regularizou o processo de elaboração e o produto acabado (ORDÓÑEZ, 2005).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2007) são considerados leites fermentados produtos resultantes da fermentação do leite ou leite reconstituído, por fermentos lácteos próprios, sendo que estes devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade, adicionados ou não de outros aditivos alimentares. Possuem como requisitos sensoriais:

- Aspecto: consistência firme, pastosa, semi-sólida ou líquida.
- Cor: branca, de acordo com adição ou não de substâncias alimentícias e/ou corantes adicionados.
- Odor e Sabor: característicos, de acordo com a (s) substância (s) alimentícia (s) e/ou substância (s) aromatizantes/saborizante (s) adicionadas.

Para a fabricação deste produto são necessárias basicamente quatro etapas de elaboração: tratamento prévio do leite (enriquecimento em sólidos lácteos, desaeração), incubação com a presença de inóculo, resfriamento e acondicionamento (ORDÓÑEZ, 2005). Para a fermentação os principais microrganismos utilizados são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus*, entre outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

Além de produtoras de ácido láctico, outros tipos de bactérias podem ser empregadas para conferir um aroma desejado ou propriedades funcionais para os produtos fermentados. Microrganismos que produzem diacetil ou acetaldeído são desejáveis para conferir sabor ou pequenas quantidades de álcool em produtos, como por exemplo em kefir. As bactérias do gênero *Leuconostoc* são usadas em produtos como *buttermilk* (leitelho fermentado) para produzir diacetil através da fermentação de citrato (MART; STEELE, 2001), já as espécies *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus* constituem a maioria dos probióticos utilizados em produtos alimentares (ZANJANI et al., 2017).

### **1.2.1 Leite fermentado probiótico.**

Os probióticos, segundo a organização mundial da saúde, são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (WHO, 2001). Os benefícios gerais dos probióticos são devido ao desenvolvimento de um ambiente intestinal mais favorável, através de mecanismos tais como: colonização com microrganismos benéficos e mais resistentes, regulação do trânsito intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta, exclusão competitiva de patógenos, uma maior renovação de enterócitos, entre outros mecanismos, ainda em estudo. Esses microrganismos de forma geral contribuem para um sistema digestivo mais saudável (HILL et al., 2014).

O bacteriologista russo Metchnikoff (Instituto Pasteur, França), no início do século 20, foi o primeiro cientista a apontar uma explicação sobre os efeitos benéficos das bactérias presentes em leite fermentado (HUGHES; HOOVER, 1991). Através de pesquisas em 1925, Minoru Shirota, microbiologista japonês na Universidade de Kyoto, descobriu que algumas bactérias da microbiota intestinal contribuíam na defesa frente a patógenos bacterianos. Estudos posteriores levaram ao isolamento e

cultivo do *Lactobacillus casei* posteriormente denominado de *Lactobacillus casei Shirota*, e em 1935 no Japão deu-se início à produção de uma bebida contendo este microrganismo, chamada Yakult®, que ao longo dos anos espalhou-se pelo mundo (MALAGO et. al., 2011).

Considerados produtos com elevado potencial para o desenvolvimento de novos alimentos, principalmente por estarem associados à saúde, os fermentados a base de leite são cada vez mais explorados pela indústria de laticínios. As vendas de leite fermentado movimentaram cerca de R\$ 580 milhões em 2010, segundo dados da Nielsen, sendo um dos principais produtos do mercado de perecíveis lácteos (SIMÕES, 2011).

### **1.3 *Lactobacillus reuteri***

Algumas espécies de *Lactobacillus* sp. são amplamente estudadas devido às propriedades probióticas relacionadas a benefícios nutricionais e terapêuticos, dentre estes o *Lactobacillus reuteri* (SILVA et al., 2010). Quando descoberto no início do século XX, este lactobacilo foi erroneamente classificado como *Lactobacillus fermentum*. Em 1960 o microbiologista alemão Gerhard Reuter descobriu diferenças entre as duas espécies e reclassificou esta nova espécie em "*Lactobacillus fermentum* biótipo II" e somente em 1980 este foi identificado como: *Lactobacilos reuteri*, por Kandler et al., que escolheram o nome em homenagem ao microbiologista alemão (LACROIX et al., 2010).

*Lactobacillus reuteri* são bactérias Gram-positivas, ácido-láticas, heterofermentativas (produzem além de lactato, etanol e CO<sub>2</sub>), anaeróbias facultativas ou aerotolerantes, capazes de usar diferentes fontes de carbono e energia para a fermentação. Este microrganismo possui uma ampla gama de hospedeiros, residindo no trato gastrointestinal (GI), vaginal e oral do homem e de outros animais de sangue quente (HAMMES; HELTER, 2006).

O *Lactobacillus reuteri* possui o certificado de "presunção qualificada de segurança" (QPS) pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia. Segundo um dos seus fabricantes, laboratório Aché, a linhagem *L. reuteri* DSM 17938 possui ação no trato gastrointestinal que define sua ação sobre determinadas patologias, sendo elas: inibição de microrganismos patogênicos, efeito modulador sobre a resposta imune,

auxílio na maturação e na motilidade gastrointestinal e equilíbrio da microbiota intestinal, prevenindo e tratando diarreias e cólicas infantis (PROVANCE, 2014).

A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída à combinação de diversos mecanismos, incluindo-se a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e à capacidade de algumas linhagens em produzir reuterina ( $\beta$ -hidroxipropionaldeído;  $\beta$  HPA) durante o metabolismo anaeróbico de glicerol (LANGA et al., 2013). A produção de reuterina por algumas cepas de *L. reuteri* é uma vantagem competitiva em seus nichos ecológicos, tais como o trato gastrointestinal (MORITA et al., 2008). Jensen et al. (2012) descreveram que a adesão em células intestinais humanas difere entre as espécies e cepas de lactobacilos. Três linhagens de *L. reuteri* (DSM 20016, mm4-1a, e fj1) apresentaram uma capacidade de adesão de 11 a 26%, significativamente maior em relação às outras cepas, tais como *L. plantarum* (6,5 a 8,9%) e *L. rhamnosus*, (1,5%, a 2,7%). Anteriormente Wang (2008) e MacKenzie (2010) já relataram uma boa adesão e produção de muco por cepas de *L. reuteri*. O estudo também revelou através de testes in vitro que este microrganismo possui o potencial de fortalecer a barreira epitelial ao longo de 24 horas, contribuindo dessa forma para sua ação probiótica.

#### 1.4 Reuterina (3-HPA)

Na fermentação do vinho por *Bacillus amaryllus*, Voisenet observou a produção de uma substância, e pela primeira vez a formação de 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) foi descrita. Durante a formação de vinho é desejável a produção de pequenas quantidades de glicerol que contribuem para a doçura e plenitude do vinho, porém algumas bactérias lácticas possuem a capacidade de converter o glicerol em 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) (VOISENET, 1914; apud RÜTTI, 2010). Segundo NEF (1904) e Rentschler e Tanner (1951) (apud RÜTTI, 2010), um amargor indesejável pode ocorrer devido às condições ácidas presentes no vinho que permitem a conversão de 3-HPA em acroleína, a qual reage com fenóis derivados que conduzem ao gosto amargo.

Apesar de ainda ser um problema para a indústria de vinho, o 3-HPA é um produto químico que pode ser utilizado para a produção de plásticos e tem uma ampla gama de potenciais aplicações em alimentos e indústrias químicas, bem como nos cuidados de saúde (VOLLENWEIDER, 2004; LACROIX, 2009) devido sua

identificação como um antimicrobiano. Por ser produzido por *L. reuteri* é denominado reuterina (AXELSSON et al., 1989; TALARICO; DOBROGOSZ, 1989).

A reuterina é um composto microbiano solúvel em água, neutro, de baixa massa molecular, ativo em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas (SILVA; 2010). É capaz de inibir o crescimento de muitos gêneros de Gram-positivas e Gram-negativas, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e também leveduras, fungos filamentosos e protozoários (TALARICO; DOBROGOZS, 1989). Esse antimicrobiano é uma mistura de formas de HPA em equilíbrio: monomérica ( $\beta$ -HPA), hidratado monomérica (HPAhidrato) e cíclico dimérica (HPA-dímero) (TALARICO; DOBROGOSZ, 1989) (Figura 1). Através de espectrofotometria de infravermelho, EL-ZINEY (2000) identificou um pico devido a (C - O), uma banda ampla e alongada (O - H) indicando a funcionalidade hidroxila, um trecho (C = O) junto com trecho de (C - H) que ilustram a presença de aldeídos.

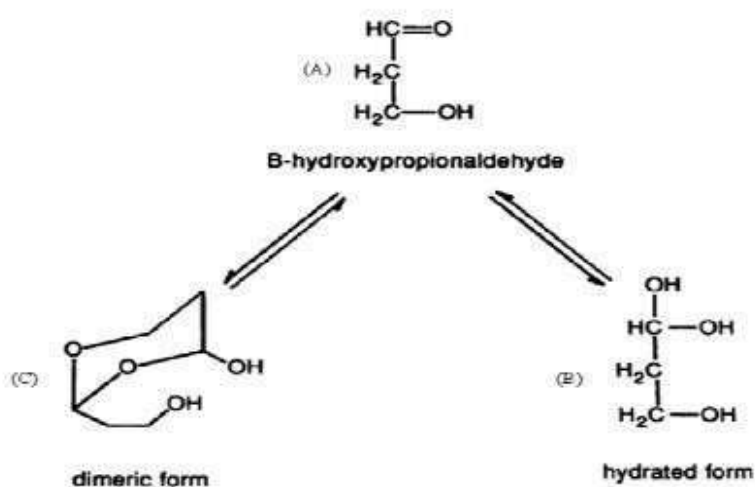


Figura 1. Formas de HPA (A) Forma monomérica, (B) Monomérica hidratada e (C) Dímero cíclico da reuterina. Fonte: Silva (2010).

Na forma de aldeído foi demonstrado que a reuterina é um agente bioativo que provoca uma resposta de estresse oxidativo por modificação de grupos tiol em proteínas e pequenas moléculas (VOLLENWEIDER et al., 2010). A ação da reuterina também é conferida ao fato dela ser considerada um análogo da D-ribose que é capaz de impedir a síntese de DNA por inibir a ribonucleotídeo redutase presente no primeiro passo da síntese de novos ribonucleotídeos para a síntese do DNA (SILVA et al.,

2010). Essa observação foi feita por El-ziney (2000) ao testar o efeito inibitório da reuterina contra subunidades B1 e B2 purificadas da ribonucleotídeo redutase isolada de *E. coli*. Esse antimicrobiano causou uma inibição de 50 % da atividade da subunidade B, a inibição da atividade da ribonucleotídeo redutase demonstrou o amplo efeito antimicrobiano. A reuterina, nesse trabalho, também foi capaz de inibir a thioredoxina, outra enzima sulfidril, o que sugere a ação da reuterina direcionada para as enzimas sulfidril.

Devido às suas características, a reuterina tem sido proposta como um potencial aditivo alimentar para prevenir a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Porém sua eficácia apresenta alguns fatores limitantes, tais como temperatura e pH (LANGA et al., 2013). Estudos já realizados comprovaram que a reuterina conserva a atividade sob temperaturas de refrigeração (ARQUÉS et al., 2008), baixos pH e altas concentrações de NaCl (RASCH, 2002).

Segundo Arqués (2004), a reuterina apresentou efeito bactericida em leite a 37 °C, inativando vários microrganismos patogênicos Gram-negativos, por outro lado a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* foi somente bacteriostática. Silva et al. (2010) em ensaios feitos com o extrato de *L. reuteri*, obtido através da fermentação em anaerobiose com adição de glicerol, conseguiu respostas de inibição de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*.

Morita et al. (2008) concluíram que a produção de reuterina por *L. reuteri* JCM1112 ocorre através da via das fosfocetolases por não possuir o gene *pfk* responsável por codificar uma enzima essencial para a via glicolítica. Em contrapartida, Arskold et al. (2008) afirmaram que a linhagem *L. reuteri* ATCC 55730 produz reuterina pelas vias fosfocetolase (PKP) e Embden-Meyerhof (EMP).

Reuterina exibe um espectro anticlostridial maior se comparado com nitrito de sódio e lisozima, inibindo o crescimento de células vegetativas e esporos de todas as linhagens de *Clostridium* spp. testadas por Avila et al. (2014). Concluindo-se que a reuterina apresentou resultados promissores para controlar o crescimento de *Clostridium* spp.

O glicerol como única fonte de carbono não é suficiente para o crescimento e geração de energia para *L. reuteri* pois este tem participação apenas na via redutiva, portanto há a necessidade de outro substrato em particular: a glicose (CUNHA;

FOSTER, 1992). Desta forma o glicerol pode ser usado como um aceptor externo de elétrons, pois o microrganismo utiliza-o para regenerar NADH (TALARICO et al., 1990). Na presença de glicose ocorre uma cofermentação em que o glicerol convertido em 3-HPA pode ser reduzido a 1,3-propanodiol um composto químico utilizado na síntese de polímeros de tereftalatos, cosméticos, adesivos, entre outros (VIERA, 2014) representado na Figura 2.

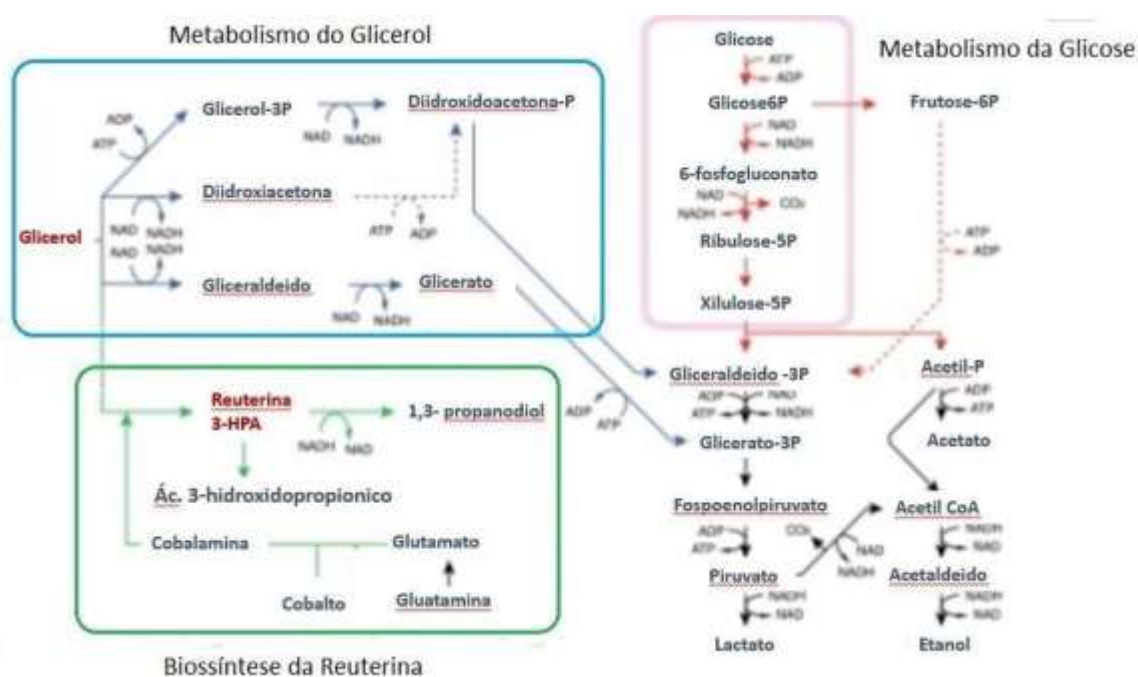


Figura 2: Biossíntese da reuterina e 1,3 propanodiol. Fonte: Morita (2008) (adaptado).

Alguns outros lactobacilos também utilizam o glicerol como fonte externa de receptor de hidrogênio, porém o *Lactobacillus reuteri* é a única espécie capaz de produzir altos níveis de reuterina na presença de glicerol, além de maior resistência deste microrganismo a atividade antimicrobiana da reuterina (SCHAEFER et al., 2010).

## 1.5 Glicerol

O glicerol quimicamente é um composto orgânico pertencente à função álcool, um tri-álcool com 3 carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3propanotriol (BEATRIZ et al. 2011) e seus sinônimos são trihidroxipropano, glicil

álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (SIDS, 2002). O termo glicerina aplicase à purificação de compostos comerciais que contêm normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (MACHADO et al., 2012)

O glicerol (Figura 3), que tem seu nome derivado da palavra grega *glykys* que significa doce, é um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro, muito viscoso, polar, altamente reagente, solúvel em água e álcool, e insolúvel em hidrocarbonetos, éter e clorofórmio.

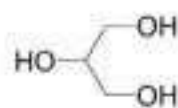


Figura 3: Estrutura do glicerol. Fonte: BEATRIZ et al. (2011).

A maior fonte para a obtenção de glicerol é através da produção de biodiesel. A utilização de fontes renováveis na indústria de matérias-primas é fundamental para o desenvolvimento da sociedade moderna (ZHOU, 2008). Entre os combustíveis renováveis mais promissores destaca-se o biodiesel, considerado limpo, produzido pela reação de um óleo ou gordura com um álcool que reduz a viscosidade (BEATRIZ 2011). Esta reação é chamada de transesterificação (Figura 4) onde obtém-se ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol. Teoricamente, para cada 3 mols de ésteres metílicos (ou etílico) é gerado 1 mol de glicerol; aproximadamente 10% da massa total do produto (ZHOU et al., 2008), desta forma o glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel.

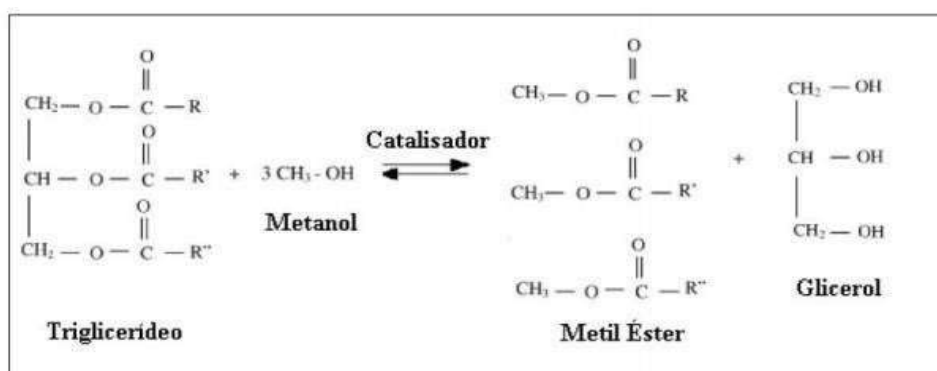


Figura 4: Reação de transesterificação. Fonte: ZHO et al., (2008).

Na forma bruta o glicerol apresenta-se como um líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (OOI et al., 2004). Contendo aproximadamente 30% (p/p) de impurezas e devido ao grande volume deste coproduto gerado pelas indústrias, o valor do glicerol bruto obtido da produção de biodiesel é baixo e encontra-se entre R\$ 0,2 a 0,4 kg. Apesar da grande utilização do glicerol por indústrias químicas, farmacêuticas, alimentícias entre outras, as quantidades de glicerol impostas pela produção de biodiesel não podem ser absorvidas, e a necessidade de converter o glicerol em produtos de maior valor agregado é um dos gargalos tecnológicos industriais (UMPIERE e MACHADO, 2013).

### **1.6 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* pertence à família *Micrococcaceae*, são cocos Gram e catalase-positivos, imóveis, não-esporulados e normalmente não-encapsulados com diâmetro que variam de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Possuem formas diversas: isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (semelhante a cacho de uvas) (SANTOS et al. 2007).

Existem cerca de 241.000 surtos por *S. aureus* nos Estados Unidos todos os anos (KADARIYA, SMITH, THAPALIYA, 2014) *S.aureus* é também uma das bactérias patogênicas mais comuns associadas à intoxicação alimentar (HENNEKINNE, DE BUYSER, DRAGACCI, 2012). Isso é devido ao fato de que este microrganismo consegue se multiplicar e produzir toxinas em diversas condições, evidenciado a partir da variedade de alimentos implicados na intoxicação alimentar estafilocócica (LOIR, BARON, GAUTIR, 2003).

Dentre os alimentos, os produtos lácteos são uma fonte conhecida de intoxicação. Por serem um bom substrato para o crescimento de *S.aureus*, a contaminação pode ocorrer no próprio leite cru (na ordenha) ou durante o seu processamento. Segundo regulamentação da FDA o limite de *S. aureus* no leite cru e produtos lácteos deve ser de  $10^4$  UFC/g (JORGENSEN et al., 2005). Desta forma alternativas para a inibição de *S. aureus* em produtos lácteos são necessárias para garantir maior qualidade e segurança para estes produtos.

### 1.7 Juçara (*Euterpe edulis Martius*)

A palmeira juçara (*Euterpe edulis Martius*) botanicamente pertence à subfamília *Arecoideae*, tribo *Arecaceae* e subtribo *Euterpeinae* (APG II, 2003). Nativas da Floresta Atlântica do Brasil, conhecida popularmente como juçara, jiçara ou palmitreiro, contém aproximadamente 7 espécies distribuídas nos trópicos ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até a Bahia.

A juçara tende a ser abundante e frequente no estrato médio da floresta (REITZ KLEIN, REIS, 1988; REIS et al., 2000b), possui elevada produção de flores, frutos e plântulas. Tem importante função ecológica especialmente, em interação com fauna, na composição das matas ciliares e na conservação de áreas degradadas ou de mata secundária (BORÉM, OLIVEIRA-FILHO, 2002; MEIRA NETO et al., 2003; REIS; KAGEYAMA, 2000). Possui também importantes características econômicas, de grande significado para a região do Vale do Ribeira-SP (RESENDE, 2002). Em seu trabalho no Vale do Ribeira-SP, Barroso (2010) constatou que 96 % dos quilombolas dessa região possuíam juçara em seus quintais, 92 % já praticaram a exploração do palmito para venda e 64 % já manejaram sementes de juçara em seus quintais para a comercialização. O estudo também apontou que o palmitreiro contribui em 20 % na alimentação humana na forma de palmito e 16 % para atrair animais de caça que também são utilizados para alimentação humana (BARROSO et al, 2010).

O palmito extraído da juçara é comestível, e muito apreciado por consumidores. A extração ocorre desde meados de 1940 devido a seu valor econômico. A intensa exploração predatória e o corte indiscriminado reduziram drasticamente as populações de juçara, sendo considerada em extinção no Rio Grande do Sul desde 2003 e classificada em 2012, pelo Centro Nacional de Conservação da Flora, como uma espécie vulnerável (CNCFLORA, 2012). Além do palmito, a juçara pode fornecer diversos produtos: caibros e ripas para construção; as folhas podem ser usadas para coberturas temporárias e como forrageiras; frutos fornecem um “vinho” semelhante ao do açaí (PIO CORRÊA, 1969).

Muito semelhante ao fruto do açaí, o fruto da palmeira juçara é constituído de drupa esférica com pericarpo pouco espesso e liso, possui coloração que passa do verde ao roxo negro durante a maturação (CERISOLA et al., 2007). São caracterizados por uma única semente, que constitui cerca de 80 % do volume total, revestidos por uma camada fibrosa, uma fina cobertura oleosa e um mesocarpo

comestível. A frutificação dessa palmeira ocorre de maneira abundante entre os meses de março e junho (CERISOLA et al, 2007).

Devido às semelhanças, a utilização do fruto da palmeira juçara da mesma forma que o açaí, através da exploração econômica da polpa, como alternativa comercial e para o manejo sustentável da espécie, apresenta-se como uma opção atraente (Quadro 1). Destaca-se, entretanto, a quantidade superior de antocianinas na juçara quando comparada ao açaí (IADEROZA et al., 1992).

Devido ao seu poder antioxidante, com valores maiores do que os encontrados na uva de vinho tinto (FERRER-GALLEGO et al., 2011; SCHAUSS et al., 2006) as antocianinas apresentam grande importância na dieta humana, auxiliando na prevenção ou retardamento de doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas; atuando contra os radicais livres; com propriedades farmacológicas utilizadas para fins terapêuticos (BOBBIO, 1995). Poulou et al. (2012) descrevem que extratos de polpa de juçara demonstraram eficácia para combater alguns dos efeitos inflamatórios e mediadores oxidativos envolvidos no envelhecimento.

Pessoa e Teixeira (2012) detectaram nos frutos teores de antocianina total de 2.956 mg / 100g, sendo identificadas em maior quantidade a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3rutinosídeo (PESSOA; TEIXEIRA, 2012). Entretanto, compostos de menor significância tais como: cianidina-3-sambubiosídeo, pelargonidina-3glicosídeo, cianidina-3-raminosídeo e perlagonidina-3-rutinosídeo também foram relatados (BRITO et al., 2007).

A quantidade de compostos fenólicos é influenciada por uma série de fatores extrínsecos durante estágio de amadurecimento e por fatores intrínsecos como modificações bioquímicas, fisiológicas e estruturais (SIDDIQUI et al., 2013; TIWARI; CUMMINS, 2013).

A utilização dos frutos da palmeira juçara para produção de polpa é um fato ainda recente comparado com a exploração da palmeira para obtenção do palmito. O plantio tem se destacado pela potencialidade de manejo sustentável, com foco nos frutos, para obtenção de polpa e sementes, visto que economicamente, torna-se mais favorável que a extração de palmito (CARTILHA DA JUÇARA, 2015).

Quadro 1: Informação Nutricional: juçara e açaí.

Para cada 100 ml	Juçara		Açaí	
		VD*		VD*
Valores energéticos	63,8 Kcal	3,44	51,4 Kcal	2,55
Carboidratos totais	5,7 g	1,9	4,3 g	1,4
Proteínas	0,67 g	0,9	0,77 g	1,03
Lipídeos (Gorduras totais)	3,5 g	6,4	1,3 g	0,24
Gorduras saturadas	0 g		0 g	
Gorduras trans	0 g		0 g	
Fibra alimentar	3,23 g	12,9	2,2 g	8,8
Antocianinas	61,85 mg		17,50 mg	
Fósforo	12,85 mg		42,82 mg	
Potássio	101,07 mg		77,08 mg	
Cálcio	33,96 mg		28,26 mg	
Magnésio	9,42 mg		10,27 mg	
Enxofre	11,14 mg		11,14 mg	
Ferro	0,59 mg		0,39 mg	
Manganês	0,31 mg		0,92 mg	
Cobre	0,12 mg		0,25 mg	
Zinco	0,23 mg		0,21 mg	
Sódio	3,51 mg		2,44 mg	
Boro	0,08 mg		0,02 mg	
Cobalto	1,52 mg		0,01 mg	
*valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 8400 Kcal. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades				

Fonte: Cartilha da juçara, 2015.

Para a produção do palmito da forma convencional a árvore leva em torno de dez anos rendendo aproximadamente 400g, e a extração ocorre apenas uma vez, devido à morte da planta, gerando um lucro médio de R\$ 0,50/árvore/ano. Em

comparação, para a produção de polpa, a árvore é preservada, produzindo até 4 kg de fruto por árvore/ano, gerando em média R\$ 15,00/árvore/ano (CARTILHA DA JUÇARA, 2015).

Nacionalmente, a utilização dos frutos da palmeira-juçara tem sido o tema de um esforço coordenado de instituições governamentais e não-governamentais através do projeto Rede Juçara (que incorporou outros projetos, como o Manejo Florestal Comunitário da Juçara e Cambuci) (IPEMA, 2014) que procura promover o uso sustentável de produtos florestais não madeireiros e os sistemas agroflorestais a partir das qualidades que a espécie *E. edulis* oferece, valorizar agricultores e comunidades tradicionais que conservam matas, quintais e diversos tipos de agro-ecossistemas com palmeiras reprodutivas (COSSIO et al., 2009).

### **1.8 Antioxidantes**

De acordo com a Anvisa (1961) as substâncias antioxidantes possuem a função de retardar a oxidação nos alimentos. Quimicamente os antioxidantes são compostos aromáticos que contém no mínimo uma hidroxila. Podem ser classificados como: primários em que atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres; ou antioxidantes secundários que agem na desativação de oxigênio singlete ou absorção da radiação ultravioleta singlete, complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, entre outros (ADEGOKE et al., 1998; DECKER, 2002).

Os antioxidantes em alimentos são uma alternativa para evitar a deterioração por oxidação destes e minimizar os danos oxidativos em seres vivos. Pesquisas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional estão em evidência. A ingestão destes tem sido associada a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo tais como câncer, doenças inflamatórias, diabetes e doenças cardiovasculares. O emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos também preocupa quanto à inocuidade e toxicidade, aumentando ainda mais o interesse em antioxidantes naturais (ZIBADI et al. 2007; SERKEDJIEVA, 2010; MORAIS et al. 2009).

Os antioxidantes mais utilizados na indústria alimentícia são os sintéticos: Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Propil Galato (PG), e Terc butil

hidroquinona (TBHQ) e os naturais: tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (RAMALHO; JORGE, 2005). Dentre os compostos naturais Narayan et al. (1999), destacaram que as antocianinas são um potente antioxidante comparada aos antioxidantes clássicos citados anteriormente.

As antocianinas são metabólitos que pertencem à classe dos flavonoides. Na natureza são responsáveis por grande parte das colorações azuis, violeta e vermelha das flores e frutos. Os diversos tipos de coloração são decorrentes das formas estruturais que variam devido a fatores como temperatura e pH, destacando-se este último como de maior importância. (Figura 5). Quando presente ou adicionada em alimentos proporciona prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos, além de conferir cor ao produto (BORDIGNON et al., 2009).

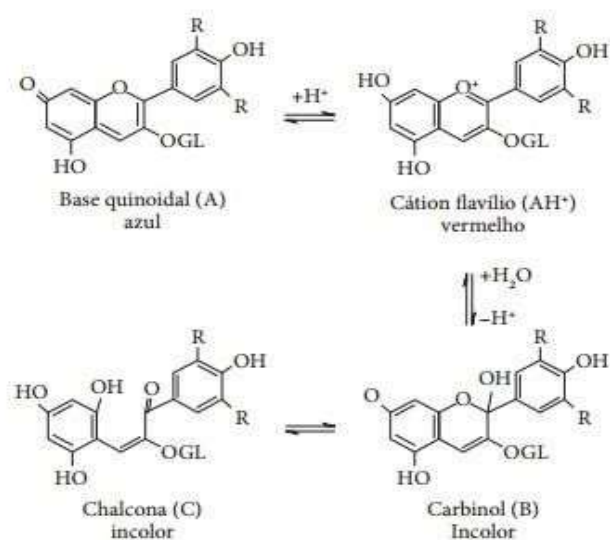


Figura 5: Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH. Cátion flavílio (AH<sup>+</sup>), a) base quinoidal; b) carbinol ou pseudobase; e c) chalcona (fonte: BORDIGNON et al., 2009).

## 11 REFERÊNCIAS

ADEGOKE, G.O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. **Journal of Food Science & Technology**, v.35, n.4, p.283-98, 1998.

ARAI, S. et al. A Mainstay of functional food science in Japan: History, Present status and future. **Functional Food Scienc.** 65(1). P 1-13. 2001.

ARQUÉS, J. L., RODRÍGUEZ, E., NUÑEZ, M., MEDINA, Inactivation of gram negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. **European Food Research and Technology**, 227. 2008.

ARQUÉS, J.L. et al. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against foodborne pathogens in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.225– 229, 2004.

ARSKOLD E. et al. Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. **Journal Bacteriology**. 190-206. 2008.

ÁVILA, M. et al. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. **International Journal of Food Microbiology** v.17, p. 70–75, 2014.

AXELSSON, L.T. et al. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 2, p. 131-136. 1989.

AZEVEDO S. Iogurte light quer conquistar consumidor que não faz dieta. TerraViva. Disponível em :< <http://www.terraviva.com.br/clique/iogurte.html>> Acesso em: 20 de abril de 2016.

ARAYAN, M.S. et al. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids** v.50, p. 1–4, 1999.

BARROSO, R.M.; REIS, A.; HANAZAKI, N. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe Edulis* Martius) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**. v.24 n.2. 2010.

BEATRIZ, A.; YARA J. K. ARAÚJO.; LIMA D. P.; Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova** v.34 n.2. 2011.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Introdução à química de alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela, 238p. 1995.

BONDIOLI, P. From Oilseeds to Industrial Products: Present and Near Future of Oleochemistry. **Italian Journal Agronomy**, v. 7, p. 129. 2003.

BORÉM, R.A.T.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Fitossociologia do estrato arbóreo em uma toposseqüência alterada de Mata Atlântica, município de Silva Jardim-RJ, Brasil. **Revista Árvore**, v. 26 p. 727-742, 2002.

BORDIGNON Jr. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29 p.183-188, 2009.

BRANDÃO, S.C.C.; Tecnologia da produção industrial de leite. **Revista Leite e Derivados**. v. 25, p.24-38, 1995.

BRASIL, Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 196. *Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos.* Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/decretos/50040\\_61.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/decretos/50040_61.htm). Acessado em: 15 de março de 2017

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999. <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acessado em 18 de abril de 2016.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2 de 07 Janeiro de 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RD\\_C\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RD_C_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acessado em 10 de abril de 2016.

BRASIL, Gram-positivos - resistência aos antimicrobianos 2007, Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_w eb/modulo3/gramp\\_staphylo.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_w eb/modulo3/gramp_staphylo.htm). Acessado em 15 de fevereiro de 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE BEBIDA LÁCTEA. Disponível em: <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>. Acessado em: 19 de abril de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista de alegações de propriedade funcional. Março, 2016. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 10 de Fevereiro de 2017.

BRITO, E. S. et al. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

CARTILHA DA JUÇARA. Rede juçara, 2015, Brasil. Disponível em [http://www.coletivocatarse.com.br/downloads/reju/cartilha\\_0.99.pdf](http://www.coletivocatarse.com.br/downloads/reju/cartilha_0.99.pdf) Acessado em: 11 de Setembro de 2015.

CERISOLA, C.M.; ANTUNES, A.Z.; PORT-CARVALHO, M. Consumo de frutos de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) por vertebrados no Parque Estadual Alberto Löfgren, São Paulo, Sudeste do Brasil. **Revista do Instituto Florestal e IF Série Registros**, v.31, p.167-71, 2007.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora 2012. Disponível em: <http://www.cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe%20edulis>. Acessado em 10 de maio de 2016.

COSSIO, R. et al. Elaboração do Projeto Piloto para o Manejo Sustentável dos Frutos da Palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) no Rio Grande do Sul. **Cadernos de Agroecologia**, v. 4, p. 2940-2943, 2009.

COSTA, N.M.B; ROSA, C.O.B Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos P: 3, 2Ed. editora Rubio 2016.

CROWE, K. M.; FRANCIS, C. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 113, p. 1096–1103, 2013.

DE BUYSER, M.L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal Food Microbiology**. V.67, p.1–17, 2001.

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p.517-42.

EL-ZINEY M. G., DEBEVERE JM, JAKOBSEN M, Reuterin. In: NAYDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC, Florida. p. 567-87. 1997

EUROMONITOR INTERNATIONAL. 2015. Disponível em: <http://www.euromonitor.com/brazil>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

FERRER-GALLEGO, R. et al. Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p.847– 853, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em:

[http://who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).  
Acessado em: 9 de maio de 2016.

GELVEZ, Y. A. J. Probióticos orais. P : 58. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmaceutica Universidade Fernando Pessoa Porto, 2016

GIBSON, G.R. e ROBERFROID M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: *introducing the concepts of prebiotics*. **Journal of Nutrition** v.125, p.1401– 1412, 1995.

GUIMARÃES, L. M; OLIVEIRA, D. S.; Influência de uma alimentação saudável para longevidade e prevenção de doenças. **Interciência e sociedade** v. 3 n.2. 2014.

HAMMES, W. & HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes. p. 320-403, 2006.

HAENLEIN, G.F.W. About evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**, v.68, p.3-6, 2007.

HELLER, K.J.; Probiotic bacteria in fermented foods; product characteristics and starter organisms, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.374S-379S, 2001

HENNEKINNE, J.A., DE BUYSER, M.L., DRAGACCI, S., *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins . **FEMS Microbiology Review**. v. 36 (4), p.815–836. 2012

HILL C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.11, p.506–514, 2014.

HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G.; Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk, **Journal of Dairy Science**, v.78, p.268-273, 1991.

IADEROZA, M. et al. Anthocyanins from fruits of açai (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Tropical Science** v.32, p.41-46, 1992.

IPEMA. Instituto de Permacultura e Ecovilas da Mata Atlântica. Disponível em: <http://novo.ipemabrasil.org.br/sobre/projetos>. Acessado em 8 de maio de 2016.

JORGENSEN, H.J, et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal Applied Microbiology**. v.99, p.158–167, 2005

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD K.; AXELSSON L.; In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.216–222, 2012.

KADARIYA, J., SMITH, T.C., THAPALIYA, D., *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease. **Biomedic Research International**, p.827-965, 2014

KULLISAAR, T. et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology** v.72, p.215–224, 2002.

LACROIX C. Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation, 1 Ed, **Woodhead Publishing Limited**, Cambridge, UK, 2010.

LACROIX, C., F. et al. Immobilized cell technology for the dairy industry in Application of cell immobilization biotechnology (V. Nevidovic, and R. Willaert, eds.). **Springer, Heidelberg and Berlin**, Germany. 2009.

LANGA, S. et. al, *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products, **Food Control** v. 33, p. 200-206, 2013.

LIMA, C.P. et al. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius) **Revista brasileira Plantas medicinais**. v.14 no.2 Botucatu, 2012.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

MACHADO B. A. S. et al. Mapeamento Tecnológico Do Glicerol/Glicerina Sob O Enfoque Em Documentos De Patentes Depositados No Brasil Cadernos de Prospecção, v.5, n.1, p.14-22, 2012.

MACKENZIE, D.A. et al. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. **Microbiology** v.156, p.3368–3378. 2010.

MALAGO, J.J., KONINKX, J.F.J.G., MARINSEK-LOGAR R. Probiotic Bacteria and Enteric Infections. p 3-37. Ed Springer. 2011.

MARTH, E., H., STEELE, J.,L., **Applied Dairy Microbiology**, 2ª Ed. p 201-327. CRC Press 2001.

MEIRA-NETO, J.A.A., MARTINS, F.R. Composição florística de uma floresta estacional semidecidual montana no município de Viçosa-MG. **Revista Árvore**, v.26, p.437-446, 2002.

MORAES, F.P.; COLLA, L. M.; Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3(2), p.109-122, 2006.

- MORITA, H. et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. **Journal DNA Research**, v. 3 p.151–161, 2008
- MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism. **Microbial physiology**, p.363. 2002.
- NARAYAN, M.S. et al. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids** v.50, p. 1–4, 1999.
- OOI, K.T. et al. Glycerol residue. A rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v.53, p.29-33, 2004.
- ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal. v.2. Porto Alegre: Artmed. 2005.
- PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA, G. H. A. Tecnologias para inovação nas cadeias Euterpe. Brasília, DF: Embrapa, 2012.
- PIO-CORRÊA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil, cultivadas exóticas. v. IV. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, p.543 1969.
- POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1084-1093, Feb. 2012.
- PROVANCE. Importado e distribuído por Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.Guarulhos, 2014. Bula.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 4, p.755-760, 2005.
- RASCH, M. The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p. 225-231, 2002.
- REIS, A.; KAGEYAMA, P.Y. Restauração de áreas degradadas utilizando interações específicas. Restauração ecológica de ecossistemas naturais. Botucatu, FEPAP. 2003.
- REIS, M.S.; REIS, A. Apresentação. p. VII-XI. In: REIS, M. S. e REIS, A. *Euterpe edulis* Martius (palmito) – biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 335 p.il. 2000.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul, 525 p. 1988.

RESENDE, U.R. 2002. As regras do jogo: Legislação floresta e desenvolvimento sustentável no Vale do Ribeira. São Paulo. Annablume Editora. FAPES. 2002.

ROCHA, A.P.M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v.46, n.2, p.97-107, 2007.

RÜTTI, D.P. Biotechnological Production Of Antimicrobial 3- Hydroxypropionaldehyde From Glycerol Using Free And Immobilised *Lactobacillus reuteri* Cells And Its Reactive Extraction, Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor . Zurich, 2010.

SANTOS, G.; COSTA, J. A. M.; CUNHA, V. C.M.; BARROS, M. O.; CASTRO, A. A. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do leite fermentado probiótico desnatado adicionado de jenipapo desidratado osmoticamente. **Revista Instituto Latico “Cândido Tostes”**, v. 67 p. 61-67, 2012.

SCHAEFER, L. et al. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. **Microbiology** v.156, p.1589– 1599, 2010

SCHAUSS, A.G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p.8598–8603; 2006

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant Effects of Plant Polyphenols: A Case Study of a Polyphenol rich Extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S. D. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants, **Science Publishers: Enfield**, p. 275 - 293, 2010.

SERJAK W. C., DAY W. H., VAN, J. M., Boruff C. S, Acrolein Production by Bacteria Found in Distillery Grain Mash. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.2, p.14– 20. 1954.

SIDDIQUI, M.W. et al. Dynamics of changes in bioactive molecules and antioxidant potential of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero at nine maturity stages. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.1141–1148, 2013 .

SIDS. Glycerol. CAS oN: 56-81-5. SIDS Initial Assessment Report. **UNEP Publications**, Paris, France, 2002

SIMÕES, K. Leite fermentado. Briga de gente grande. Disponível em: <http://www.sm.com.br/detalhe/leite-fermentado-briga-de-gente-grande>. Acessado em: 20 de abril de 2016.

SILVA H. S.; RAMOS R. J.; CIROLINI A.; MIOTTO M.; BASSEGIO A. M.; C. R. W. VIEIRA C. R. W. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse alimentar, **Revista Instituto Adolfo Lutz** (Impr.) v.69, n.4, 2010.

SWAIN, T.; HILLS, W.G. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-69, 1959.

TALARICO, T. L., W. J. DOBROGOSZ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.3, p.674-679, 1989.

TIWARI, U., & CUMMINS, E. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. **Food Research International**, v.50, p.497–506, 2013

UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. **Revista Virtual de Química**, v.5 (1), p.106-116. Data de publicação na Web: 29 de novembro de 2013

VIEIRA, P. B. Produção de 1-3 propanodiol por *Lactobacillus reuteri*. Tese para obtenção do título de doutor em ciências. Escola politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.

VOLLENWEIDER, S. et al. Unraveling the HPA system; An active antimicrobial agent against human pathogens. **Journal of Biological Chemistry**. 2010.

VOLLENWEIDER, S. et al. Purification and structural characterization of 3hydroxypropionaldehyde and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3287-3293, 2003.

ZANJANI M. A. K. et al. Promoting *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentes* survival by microencapsulation with diferente starches and chitosan and poly L-lysine coatings in ice cream. **Journal of Food Processing and Preservation**, p 1-10, 2017

ZHOU, C. H.; et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v.37, p.527. 2008.

ZIBADI S. et al. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutricion Research** v.27, p.408-416; 2007

WANG, B. et al. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. **Current Microbiology**, v.57, p.33–38, 2008.

WILDMAN, R. E. C. In R. E. C. Wildman (Ed.), Handbook of nutraceuticals and functional foods. **New York: CRC Press**. P: 5. 2016.

## Capítulo 2. Elaboração de leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 com adição de extrato de juçara e determinação da reuterina *in situ*.

### Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 com adição de extrato de juçara, avaliando a produção de reuterina *in situ*. Para isso foram realizadas análises de viabilidade celular, pH, acidez titulável, ácidos orgânicos e açúcares durante 24 horas de fermentação e no armazenamento dos produtos por 30 dias à 4 °C, assim como ensaio de inibição e quantificação da reuterina, simulação gastrointestinal e aceitação sensorial. A contagem inicial de 7 log UFC/ mL reduziu a 6 log UFC/mL em 30 dias. A quantificação da reuterina foi de  $0,32 \pm 0,02$  mM para o extrato bruto e  $0,43 \pm 0,01$  mM para o extrato 2,5 vezes concentrado, concentração que apresentou inibição para *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 e *S. aureus* N315. Para açúcares obteve-se os valores de  $3,53 \pm 0,54$ ,  $4,60 \pm 0,41$ ,  $0,79 \pm 0,25$  e  $0,04 \pm 0,00$  mg/mL para sacarose, lactose, galactose e frutose respectivamente ao final de 30 dias de armazenamento e a quantidade neste mesmo período de ácido láctico foi de 8,66 mg/mL. Na simulação gastrointestinal a sobrevivência foi de 2,47 log de UFC/mL ao final de 6 horas de incubação e o produto obteve nota 7 para aceitação global na análise sensorial, adequado aos valores encontrados em produtos já comercializados. Desta forma o produto desenvolvido apresentou parâmetros compatíveis com a legislação, com boa aceitabilidade, utilizando um fruto pouco conhecido.

**Palavras-chaves:** alimento funcional, bactéria láctica, simulação gástrica, *Euterpe edulis*, antimicrobianos.

## 1 Introdução

A área de laticínios está entre as que possuem maior crescimento na variedade de produtos funcionais, dentre iogurtes, bebidas à base de soro de leite, e outros leites fermentados (Brandão, 2002). A utilização de culturas probióticas, tais como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*), e/ou adição de substâncias prebióticas (oligossacarídeos, fibras) torna possível esta funcionalidade (Saarela et al. 2002). A sobrevivência das bactérias benéficas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações elevadas (a partir de  $10^6$  UFC/ mL ou g). Além disso, é importante que estes microrganismos sobrevivam às condições hostis encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e desta forma garantir os benefícios à saúde do consumidor (Jelen & Lutz, 1998).

Os testes de sobrevivência em condições gástricas e entéricas simuladas estão entre os ensaios *in vitro* que são mais sugeridos para a avaliação de células viáveis após a administração oral (Gbassi, Vandamme, Yolou, & Marchioni, 2011). Porém um estudo da tolerância às condições gastrointestinais em alimentos prontos, já com as cepas adicionadas, traz resultados mais corretos, pois vários fatores intrínsecos e extrínsecos aos alimentos (incluindo os ingredientes, o processo de fabricação, as características físico-químicas e as condições de armazenamento) podem afetar a sobrevivência dos microrganismos alterando essa propriedade funcional (Schillinger, Guigas & Holzapfel, 2005).

Em lácteos fermentados é característica a produção de ácidos orgânicos como ácido láctico, cítrico e compostos voláteis que influenciam diretamente os aspectos sensoriais tais como sabor e consistência, interferindo na qualidade final do produto (Østlie, Helland, & Narvhus, 2003). A concentração de ácido láctico

precisa estar próxima a 8mg/mL e o pH entre 4,2 e 4,4 para qualidades sensoriais satisfatórias de acidez (Jakobsen & Narvhus, 1996).

A reuterina ou hidroxipropionaldeído (3-HPA) é um antimicrobiano produzido por *Lactobacillus reuteri* em condições de anaerobiose e na presença de glicerol. Este composto inibe o crescimento de muitas espécies Gram-positivas e Gramnegativas tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e também leveduras, bolores e protozoários (Talarico & Dobrogosz, 1989). Devido ao seu amplo espectro de ação tem sido proposta para melhorar a segurança e a qualidade dos alimentos, reduzindo a adição de conservantes químicos (Vollenweider, Grassi, König, & Puhan, 2003).

Associada ao processo de fermentação, a adição de frutas melhora as características de aroma e sabor de bebidas lácteas, visto que a incorporação de diferentes proporções de suas polpas resulta no aumento da aceitabilidade (Costa, Mendes, De Araujo & Pereira, 2012). Sendo assim, a utilização de frutas típicas da flora brasileira, tais como juçara, contribuem sensorialmente com características agradáveis de bebidas lácteas e torna-se uma alternativa alimentar. E desta forma, contribui para maior consumo de produtos lácteos, assim como desse tipo de fruta, acarretando na divulgação e interesse no cultivo e preservação desta espécie.

Da mesma família do açaí, juçara (*Euterpe edulis Martius*) é uma palmeira amplamente encontrada no Brasil, próxima aos rios e matas úmidas. Além do sabor agradável, o fruto é refrescante e energético. Seu valor nutricional é superior ao açaí, em relação a alguns nutrientes por exemplo ferro, zinco, potássio, e antocianina presentes no fruto. Testes *in vitro* de simulação intestinal com a juçara revelaram que a presença deste fruto aumentou a população de bifidobactérias em

24 horas de fermentação (Guergoletto et al. 2016). A extração deste fruto é uma possibilidade sustentável, proporcionando trabalho digno e legalmente viável para as famílias carentes das regiões de Mata Atlântica, sendo economicamente mais favorável que a exploração do Palmito (Conab, 2013). Entretanto, um dos problemas da comercialização é a alta perecibilidade, mesmo sob refrigeração (Alexandre, Cunha & Hubinger, 2004). Por isso é de extrema importância a fabricação de produtos processados, como leite fermentado, garantindo maior utilização dos frutos.

Desta forma, buscando uma alternativa alimentar para o uso do fruto da juçara em adição à sua propriedade benéfica e sensorial, o presente estudo objetivou desenvolver um leite fermentado por *L. reuteri* com adição de extrato de juçara e avaliar as propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto formulado. Além disso, foi verificada a produção de reuterina *in situ* e sua atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Microrganismos**

A linhagem de *Lactobacillus reuteri* LR92 (Sacco DSM 26866- Cadorago, Itália) na forma liofilizada, foi mantida em leite na concentração de 0,1% (m/v) Previamente aos ensaios, 1 mL da cultura estoque foi ativada e cultivada a 37° C em condições anaeróbias em leite reconstituído (10% m/v) estéril por 24 horas (Langa et al., 2013).

As culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 e N315 (provenientes do

Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil) foram mantidas em solução de glicerol 40% em nitrogênio líquido e previamente ativadas em ágar Mueller-Hinton por 24 horas a 37° C.

## **2.2 Extrato de juçara.**

Os frutos de juçara foram colhidos nas safras dos palmiteiros produzidos na Fazenda Bimini (Rolândia-PR, Brasil). Foram lavados em água corrente e higienizados durante 30 minutos em água contendo cloro a uma concentração de 200 mg / kg. Em seguida, enxaguados e despoldados com água potável na proporção de 2:1 (m / v), utilizando uma batedeira planetária, durante 1 minuto em baixa frequência, para preservar a viabilidade das sementes. As sementes foram separadas para o plantio e o extrato congelado em frações até a sua utilização (Guergoletto et al., 2016).

Para a utilização, o extrato foi descongelado, filtrado em filtro de tecido sintético para remoção da borra e pasteurizado por 1 minuto a 80° C (Cohen & Alves, 2006).

## **2.3 Leite fermentado**

Em 300 mL leite desnatado (Molico<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) (previamente pasteurizado a 95 °C por 5 minutos) com 18 g/L de sólidos totais, foi adicionado 100 mM de glicerol grau alimentício (Arcolor<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) e, inoculados 10 mL/L da cultura de *L. reuteri* ativa. O leite foi incubado em recipientes estéreis em anaerobiose à 37 °C até atingir pH de 4,5 (aproximadamente 12 horas). Para as amostras de leite com adição de extrato de juçara adicionou-se 50 mL/L de extrato de juçara (item 2.2) em seguida acrescentou-se 10 % (m/v) de sacarose nas

amostras com e sem extrato. As amostras permaneceram estocadas em vidro à 4 °C por 30 dias em condições anaeróbicas (Adaptado de LANGA, 2013).

#### **2.4 Contagem de *Lactobacillus reuteri***

A contagem de *Lactobacillus reuteri* foi realizada durante a fermentação, a cada 4 horas (por 24 horas) e após 1, 15 e 30 dias de armazenamento à 4 °C no leite com e sem extrato de juçara (LFJ e LF respectivamente), utilizando plaqueamento em profundidade, em meio MRS (deMan, Rogosa e Sharpe) e incubação a 37 °C, por 48 h, sob anaerobiose.

#### **2.5 Determinação do pH e acidez titulável**

O pH das amostras foi determinado durante a fermentação e nos intervalos de 1, 15 e 30 dias de armazenamento à 4 °C, utilizando-se potenciômetro digital (KASVI). Para a determinação da acidez das amostras LFJ e LF foram analisadas durante o armazenamento à 4 °C, utilizando o método do Instituto Adolfo Lutz (2008), por meio de titulação com NaOH 0,1 M, expressando-se o resultado em g de ácido láctico.100 g/mL.

#### **2.6 Determinação da reuterina**

Para a determinação da produção da reuterina as amostras de leite fermentado com adição de extrato de juçara foram homogeneizadas e centrifugadas (12000xg, 20 min, 4 °C) e os sobrenadantes filtrados (0,22 mM). Uma alíquota deste sobrenadante (extrato bruto) foi liofilizada (-40 °C) até secagem total da amostra e resuspendida com água destilada na concentração de 2,5 (extrato concentrado). O extrato bruto e o

extrato concentrado foram utilizados para quantificar a presença de reuterina em triplicata pelo método fotométrico citado por TOBAJAS *et al.* (2007).

Acroleína foi utilizada para calibração em tampão fosfato 50mM pH 7,5. Brevemente, 1mL da amostra foi adicionada a 0,75 mL de triptofano 10mM dissolvido em 0,05N HCL. Após adição de 3mL de HCL 37%, a mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos e a absorvância medida a 560nm. A partir de uma resposta linear da acroleína em tampão fosfato (curva padrão obtida entre as concentrações 0,05 a 6 mM), foi possível a quantificação molar da reuterina utilizando o padrão acroleína (Tobajas, Mohedano, Casas, & Rodríguez, 2007).

## **2.7 Ensaio de inibição**

Para os ensaios de inibição foram utilizados os sobrenadantes do leite fermentado com juçara conforme descrito no item 2.6. Para testar a atividade antimicrobiana das frações aquosas foram realizados testes de poços. Para o teste, 1mL de *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 ou N315 em fase exponencial a uma concentração de  $10^8$  UFC/mL (0,5 na escala de McFarland) foram transferidos para 20 mL de Agar Mueller Hinton (37 a 40°C) e vertidos em placas. Após solidificação do meio, os poços foram feitos com diâmetro padronizado com o auxílio de uma ponteira plástica (de 1000  $\mu$ L), esterilizada, para perfurar o ágar, e adicionado 50  $\mu$ l do extrato bruto ou concentrado, aguardando meia hora para a difusão destes, e as placas incubadas à 37°C por 24 horas. A leitura do halo de inibição foi realizada com paquímetro (Silva *et al.*, 2010).

## **2.8 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos**

### **2.8.1 Extração e preparo das amostras**

Para a extração de LF e LFJ, 500 µL de cada amostra foram homogeneizados em vortex com 4500 µL de água miliQ, depois transferidos para tubos e centrifugados em ultra centrifuga (HITACHI, Ibaraki, Japão) por 15 minutos a 15 °C e 230600 xg. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro PVDF 0,22 µm (Millex®) e armazenados em vials para a realização das análises.

### **2.8.2 Determinação de açúcares**

A determinação e quantificação dos açúcares lactose, galactose, glicose, frutose e sacarose, foi realizada nas amostras extraídas de acordo com o item 2.8.1 utilizando como fase móvel água ultrapura (Mili-Q). O sistema instrumental utilizado consistiu em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) composto de bomba de alta pressão (LC-20AT); injetor automático (SIL-20AC HT), com volume de injeção ajustado para 20 µL; detector por índice de refração (RID-10A); forno de coluna (CTO-20A), mantido em temperatura constante de 85 °C; módulo de controle (CBM-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm na forma iônica Pb+2, Biorad, CA, EUA). A aquisição de dados e a integração dos picos cromatográficos foram obtidos com o auxílio do software LC Solutions (Shimadzu corp., Kyoto, Japão) (Pauli, Cristiano, & Nixdorf, 2011).

### **2.8.3 Determinação de ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos, láctico, málico, cítrico, succínico e acético, nas amostras extraídas de acordo com o item 2.8.1 foram detectados em cromatógrafo líquido de

alta eficiência Shimadzu LC 20 A, Kyoto, Japão), composto por bomba de alta pressão LC- 20AT, injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Utilizou-se coluna cromatográfica Shiseido CapCell Pak 5 $\mu$  C18 MG 250 x 4,6mm. Como fase móvel, foi utilizada uma solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,4 na vazão de 1,0 mL min/mL , a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o volume de injeção em 20  $\mu$ L. A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de índice de refração (RID10A) e arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), programado em comprimento de onda fixo de 215 nm e no modo de varredura de 200 a 400 nm. A obtenção e tratamentos dos dados foram realizados com o auxílio do Software Shimadzu LCsolution (Kyoto, Japão) (Reuter, 2015).

## 2.9 Simulação gástrica

A avaliação da resistência de *L. reuteri*, em condições similares à digestão gástrica e entérica (Nejati, Gheisari, Hosseinzadeh, & Amin, 2011). Primeiramente na fase gástrica 1 grama de cada amostra foi adicionada em 10 mL de solução salina 0,5% ajustando o pH entre 1,4-1,9 com solução de HCl 0,5 M, adicionando as enzimas pepsina e lipase de modo a atingir a concentração de 0,3g/L e 0,9 g/L respectivamente. Incubou-se por 2 horas a 37 °C seguido por plaqueamento. Na segunda fase (entérica 1) o pH das amostras foi ajustado para 4,3- 5,2 com solução alcalina (150 mL de NaOH 1M com 14 g de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na.2H<sub>2</sub>O), adicionando as soluções de bile e pancreatina atingindo as concentrações na amostra de 10 g/L e 1g/L respectivamente nas amostras, mantendo-se a 37 °C por 2 horas, seguindo de

plaqueamento. Na última fase (entérica 2) o pH foi ajustado para 6,7 – 7,5 com a solução alcalina e adicionando novamente bile e pancreatina, mantendo-se a 37°C por 2 horas seguindo o plaquamento. Os resultados foram expressos em log UFC/mL de amostra.

## **2.10 Análise Sensorial**

Previamente à análise sensorial foram verificadas as condições higiênico-sanitárias considerando os padrões microbiológicos exigidos para leites fermentados, segundo a RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001.

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (parecer nº 1684498) LFJ e logo após a fabricação, foi conduzido o teste no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UEL por 90 provadores não treinados. Os parâmetros aroma, sabor, impressão global, cor e textura, foram avaliados através da escala hedônica de 9 pontos. Os provadores também responderam a um questionário referente a pesquisa de consumo.

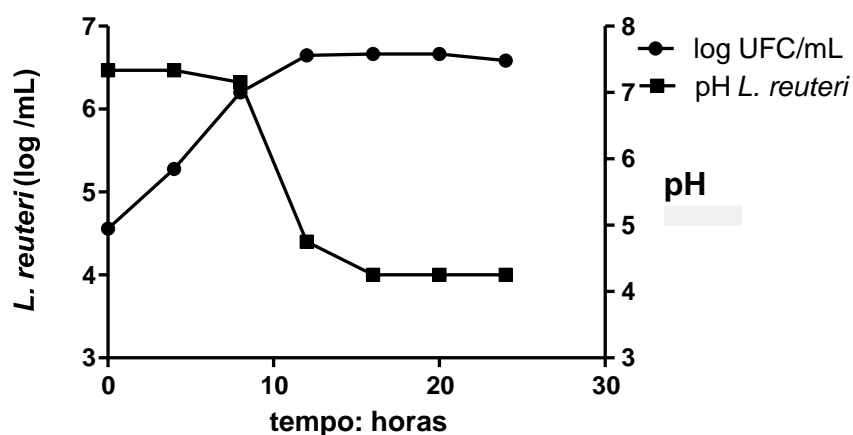
## **2.11 Análise Estatística**

Todas as análises foram realizadas em triplicata genuína, sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação de médias ao nível de 5 % de significância utilizando o programa Statistica 10 (StatSoft® Inc, Estados Unidos, 2011).

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Contagem, pH e acidez titulável

Durante 24 horas de fermentação o pH reduziu de 6,47 para 4,1 ao final do período. A contagem de *L. reuteri* que no início era de 4,95 log UFC/mL atingiu contagem máxima de 7,58 log UFC/mL em 16 horas de fermentação, conforme apresentado na Fig. 1.



**Fig. 1.** Crescimento de *L. reuteri* e valores de pH durante 24 horas de fermentação em leite. Nota: Devido a escala dos gráficos, não foi possível a visualização das barras de erros nos tempos analisados.

O valor final de pH está de acordo Helland et al., (2004) após 24 horas, porém o autor relatou valores superiores de viabilidade celular no mesmo tempo de fermentação deste estudo (9 log UFC/mL). Estes resultados divergentes podem estar relacionados a diferentes tipos de cepa, temperatura de incubação, concentração de ácido orgânico, percentagem do inóculo, suplementação do meio, entre outros que podem afetar a viabilidade celular (Gueimonde et al., 2004).

Os produtos LF e LFJ após 1 dia de armazenamento apresentaram valores de pH de 4,5 e 4,7 respectivamente, diminuindo para 4,4 (LF) e 4,5 (LFJ) em 30 dias de armazenamento. Ambos os leites no dia 1 apresentaram 7 log UFC/mL porém ao final

do período de armazenamento atingiram valores próximos a 6 log UFC/mL (Tabela 1) significativamente diferentes do primeiro dia de armazenamento. Hekmat & Reid (2007) e Langa et al. (2013) apresentaram resultados semelhantes, o leite fermentado com *L. reuteri* a temperaturas de refrigeração apresentou redução nas contagens de até 1,93 log em iogurtes nos casos estudados. O processo de morte celular parece estar mais relacionado com a temperatura de armazenamento, do que com os valores de pH. Mesmo com a diminuição da viabilidade destas bactérias durante o período de armazenamento, a manutenção da alegação de suas mais propriedades funcionais depende de ensaios clínicos em seres humanos (FAO/OMS, 2002).

**Tabela 1:** Contagem de *L. reuteri* durante 30 dias de armazenamento a 4°C em leite fermentado com extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF)

Armazenamento (Dias)	População de <i>L. reuteri</i> (log UFC / mL)	
	LFJ	LF
<b>Dia 1</b>	7,0 <sup>Aa</sup> ± 0,01	7,0 <sup>Aa</sup> ± 0,01
<b>Dia 15</b>	6,8 <sup>Aa</sup> ± 0,	6,7 <sup>Aa</sup> ± 0,05
<b>Dia 30</b>	6,2 <sup>Ba</sup> ± 0,2	6,0 <sup>Ba</sup> ± 0,01

\*Letra maiúsculas diferentes em relação ao tempo de armazenamento, (diferentes a 5% de significância). Letras minúsculas em amostras diferentes diferem a 5% de significância.

Somente o LFJ apresentou diferença de acidez titulável estatisticamente significativa ao longo de 30 dias de estocagem, variando de 0,99 % (g de ácido láctico) a 1,1 % (g de ácido láctico). Ginslov (1970, apud Fernandes et al. 2011) afirmou que para a aceitabilidade do produto a acidez precisa ser menor que 1,2%, que está de acordo com os valores encontrados nesse trabalho. Este parâmetro é um importante indicador de qualidade produtos fermentados, pois em excesso, pode denotar más condições de armazenamento dentre outras possíveis causas.

### 3.2 Ensaio de Inibição e quantificação da reuterina

O extrato de LFJ concentrado 2,5 vezes apresentou efeito antimicrobiano para as linhagens testadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 e *Staphylococcus aureus* N315 (multirresistente). Hill & O'keeffe (1999) apontaram em seus estudos que dentre os microrganismos de significância em saúde pública que são inibidos pela reuterina estão incluídos os do gênero *Staphylococcus*. Os halos de inibição para *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 foram de 8 mm  $\pm$  0,0 e para *Staphylococcus aureus* N315 de 6 mm  $\pm$  0,0 conforme demonstrado na Fig. 2. A adição de *L. reuteri* e de glicerol ao leite proporciona a produção de reuterina nos produtos lácteos, que podem atingir concentrações inibitórias contra uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes, Gram-negativas e Gram-positivas (Stevens, Vollenweider e Lacroix, 2011).



**Fig. 2:** Halos de inibição de extrato de Leite fermentado (com adição de extrato de juçara - LFJ) na concentração 2,5 vezes para *S. aureus* ATCC 29231 e *S. aureus* N315.

Silva, Ramos, Cirolini, Miotto, (2010) ao testarem o efeito antimicrobiano do extrato de *L. reuteri* ATCC 1428 descreveram uma inibição com halos de 4,3 mm para *Staphylococcus aureus*, neste mesmo trabalho também houve inibição pelo extrato

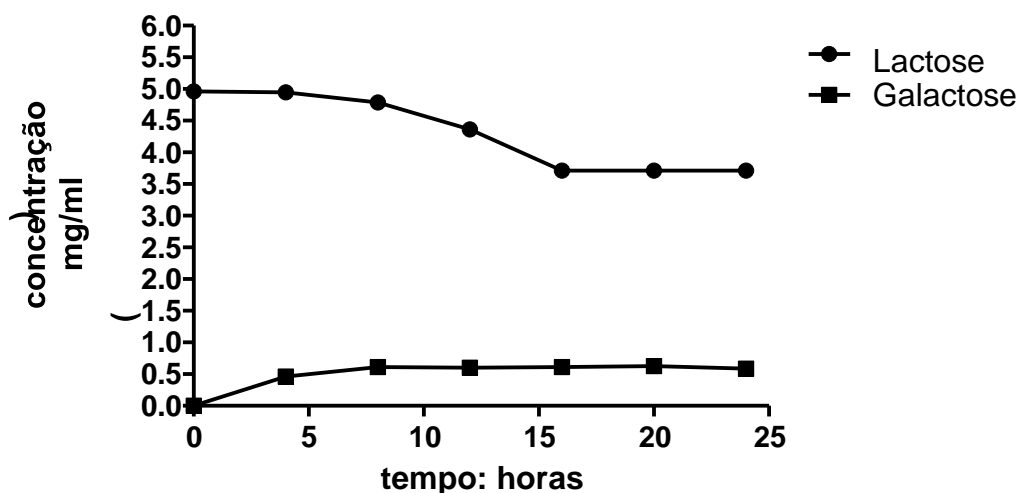
para *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, e *Vibrio cholerae* pelo extrato. Langa et al., (2014) em seus trabalhos também descreveram o efeito inibitório da reuterina contra cepas de *Staphylococcus aureus*, que neste caso atuou como bacteriostática após 4 horas e bactericida após 24 horas a 37 °C.

A quantificação da reuterina pelo método indireto através da curva de acroleína apresentou uma concentração de  $0,32 \pm 0,02$  mM para o extrato bruto e  $0,43 \pm 0,01$  mM para o extrato concentrado. Langa et al., (2013) obtiveram resultados de 0,21 a 0,75 mM para concentração de reuterina para as diferentes cepas utilizadas no iogurte produzido com 100mM de glicerol, condições semelhantes às do presente trabalho.

Axelsson, Chungf, Dobrogosz e Lindgrent, (1989) e Cleusix, Lacroix, Vollenweider, Duboux, e Le Blay, (2007) relataram que as concentrações de reuterina necessárias para inibir o crescimento de bactérias lácticas são de três a cinco vezes mais elevadas do que as necessárias para inibir outras bactérias.

### **3.3 Determinação de açúcares.**

Em 24 horas de fermentação (Fig 3) foi possível observar que a lactose presente inicialmente no leite na concentração de 4,96 mg/mL diminuiu gradativamente para 3,71 mg/mL indicando um consumo deste carboidrato pelo *L. reuteri*. A maior porcentagem de consumo (15 %) ocorreu durante os intervalos de 12 para 16 horas, coincidindo com um maior número de células viáveis. É possível observar também que após o consumo da lactose pela bactéria há detecção de galactose, não detectada inicialmente. Assim como grande parte dos lactobacilos, *L. reuteri* possui a enzima  $\beta$ -galactosidase (Splechtna et al., 2006) responsável pela hidrólise da lactose, resultando na liberação dos monossacarídeos que a compõem: glicose e galactose.



**Fig 3:** Consumo de açúcares por *L. reuteri* em 24 horas de fermentação em leite.

Nota: Devido a escala dos gráficos, não foi possível a visualização das barras de erros nos tempos analisados.

Nos produtos LF e LFJ (tabela 2) encontrou-se, sacarose, além da lactose e galactose, devido a adição de 10 % deste dissacarídeo ao produto final. LFJ apresenta valores maiores de sacarose e presença de frutose, devido ao fato do fruto da juçara apresentar esses açúcares na proporção de até 3,55% de matéria seca (Alexandre, Cunha e Hubinger, 2004).

**Tabela 2:** Determinação de açúcares em leite fermentado com *L. reuteri* com (LFJ) e sem adição de extrato de juçara (LF) em 30 dias de armazenamento (4°C)

Dias	Amostras	Sacarose mg/mL	Lactose mg/mL	Galactose mg/mL	Frutose mg/mL
1	LFJ	4,59 <sup>a</sup> ± 1,93	4,66 <sup>a</sup> ± 2,86	0,71 <sup>a</sup> ± 0,30	0,05 <sup>a</sup> ± 0,02
	LF	3,20 <sup>a</sup> ± 0,83	4,94 <sup>a</sup> ± 1,21	0,60 <sup>a</sup> ± 0,02	ND
15	LFJ	4,10 <sup>a</sup> ± 0,67	4,62 <sup>a</sup> ± 1,32	0,79 <sup>a</sup> ± 0,25	0,04 <sup>a</sup> ± 0,00
	LF	3,12 <sup>a</sup> ± 0,03	4,94 <sup>a</sup> ± 0,01	0,80 <sup>a</sup> ± 0,06	ND
30	LFJ	3,53 <sup>a</sup> ± 0,54	4,60 <sup>a</sup> ± 0,41	0,79 <sup>a</sup> ± 0,25	0,04 <sup>a</sup> ± 0,00
	LF	3,04 <sup>a</sup> ± 0,02	4,73 <sup>a</sup> ± 0,80	0,66 <sup>a</sup> ± 0,00	ND

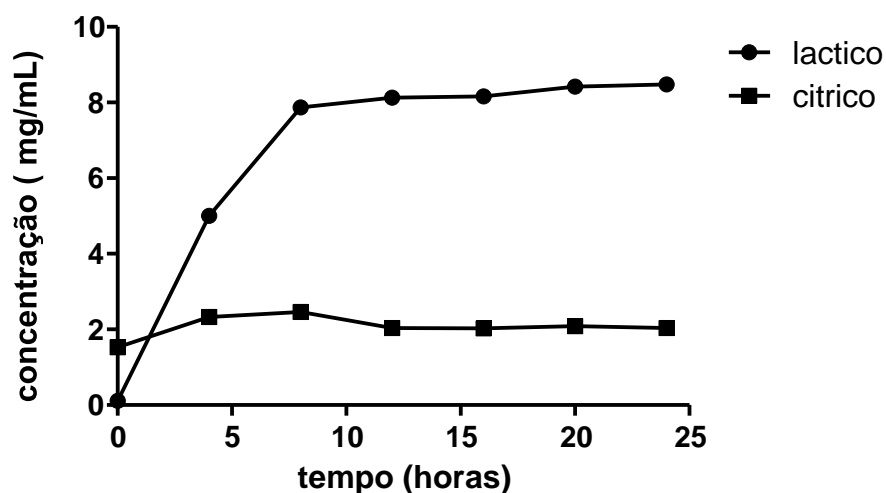
Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente a 5% de significância

### 3.4 Determinação de ácidos orgânicos

Durante as 24 horas de fermentação (Fig. 4) é possível observar um aumento acentuado na concentração de ácido láctico ao passo que concomitantemente a redução do pH (fig.1). Inicialmente a concentração encontrada de 0,11 mg/mL (pH 6,47) passou para 8,48 mg/mL (pH= 4,1) ao final do período.

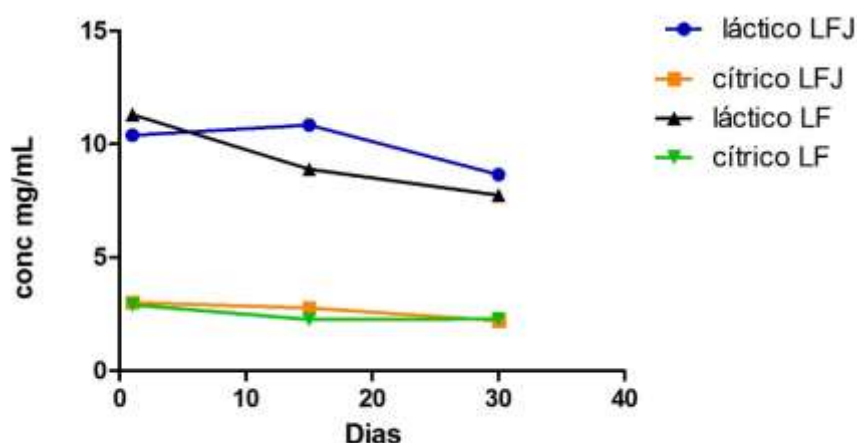
A concentração de ácido cítrico manteve-se estável durante a fermentação com valores de no máximo 2,4 mg/mL resultando próximo ao encontrado por Østlie et al., (2003) que obtiveram valores entre 1,97 a 2,22 mg/mL, porém no estudo citado a cepa de *L. reuteri* SD2112 foi capaz de metabolizar completamente o citrato entre 4 e 6 horas ocasionando a produção de ácido acético. No presente estudo em nenhum dos tempos ou dos produtos foi encontrado concentrações significativas de ácido acético. Os demais ácidos málico, succínico e acético não foram detectados nas condições do experimento.

A conversão de ácido no leite tem como principal substrato a lactose. Porém, a fermentação de lactose não está limitada a quantidade disponível deste e sim pela produção de ácido láctico e diminuição simultânea do pH, que pode inibir os microrganismos, responsáveis pela fermentação, muito antes da lactose ser totalmente consumida (Narvhus, Østeraas, Mutukumira, & Abrahamsen, 1998). A concentração dos ácidos também depende de algumas variáveis tais como: cultura starter, tipo de leite, tempo e temperatura de incubação (Akalin, Gönç, & Düzel, 1997).



**Fig. 4:** Produção de ácidos orgânicos durante 24 horas de fermentação de leite por *L. reuteri*. Nota: Devido a escala dos gráficos, não foi possível a visualização das barras de erros nos tempos analisados.

Nos produtos LF e LFJ também houve a predominância do ácido láctico, que sofreu uma queda estatisticamente significativa na concentração durante os 30 dias de armazenamento. O ácido cítrico também foi quantificado, não apresentando alterações significativas no período estudado (Fig. 5).



**Fig. 5:** Ácidos orgânicos durante o armazenamento de leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e Leite fermentado (LF). Nota: Devido a escala dos gráficos, não foi possível a visualização das barras de erros nos tempos analisados.

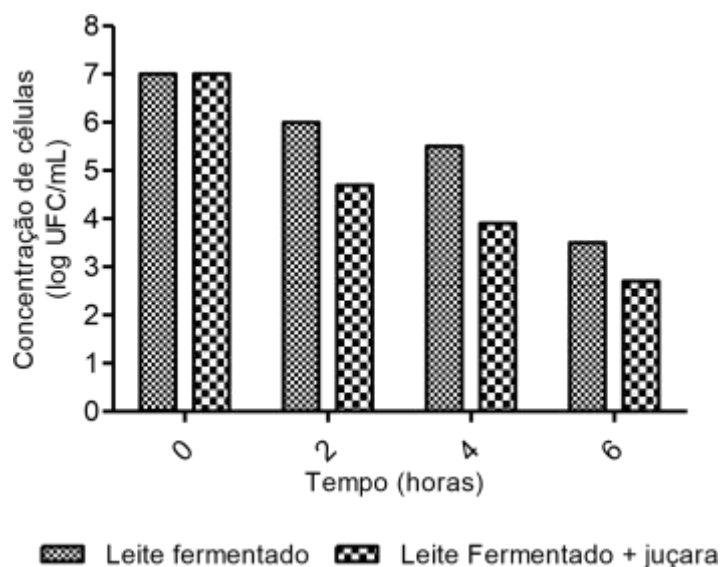
### 3.5 Simulação Gástrica

Neste estudo os produtos LF e LFJ, ambos no dia 1 e contagem inicial de com 7 log de UFC de *L. reuteri*, foram submetidos ao ensaio de simulação gástrica (Fig. 6). Na primeira etapa em que o pH estava entre 2,3 a 2,6 (simulação da fase gástrica) para o LF houve a queda de um ciclo log na contagem (6 log de UFC/mL), enquanto que para LFJ a queda foi maior obtendo-se ao final a contagem de 4,7 log de UFC/mL. Estas sobrevivências são maiores que a relatada por Champagne & Gardner (2008) que ao final da fase gástrica obtiveram uma sobrevivência de 2,7 log de UFC/mL para a cultura de *L. reuteri* em suco de fruta concentrado (mistura de abacaxi, laranja, maçã, pera, uva, maracujá, etc), porém menor que a relatada por Wang, Lin, Ng & Shyu (2010) em que a contagem ao final da fase gástrica foi de 7.39 log de UFC/mL de *L. reuteri* em caldo MRS. A tolerância ácida das bactérias é importante não só para suportar esta fase da simulação, mas também como um pré-requisito para seu uso como um alimento funcional, permitindo que os microrganismos sobrevivam por

períodos mais longos em alimentos ácidos , tais como iogurte e leite fermentado (Bertazzoni Minelli et al., 2004).

O número de células viáveis ao final de todas as etapas da simulação para LF e LFJ foram de 3,47 log de UFC/mL e 2,47log de UFC/mL respectivamente. Bedani, Vieira, Rossi, & Saad (2014) observaram que a adição de polpas de frutas ao iogurte estudado pode estar envolvida na diminuição da sobrevivência probiótica nas condições gastrointestinais simuladas, sendo necessários mais estudos para determinar se polpas e extratos de frutas podem influenciar a resistência de culturas probióticas durante a passagem através do trato gastrointestinal.

A sobrevivência de *L. reuteri* após 6 horas de simulação em LF e LFJ foi menor do que a descrita por Wang et al.(2011) de 6,72 log de UFC/mL de *L. reuteri* em caldo MRS. A verificação da tolerância de microrganismos ao final da simulação em condições gastrointestinais pode ajudar a selecionar uma matriz alimentar adequada, cepas e condições de processamento que garantam a sobrevivência do microrganismo de interesse e eficácia no trato gastrointestinal (Buriti, Castro, & Saad, 2010; Schillinger, Guigas, e Holzapfel, 2005).



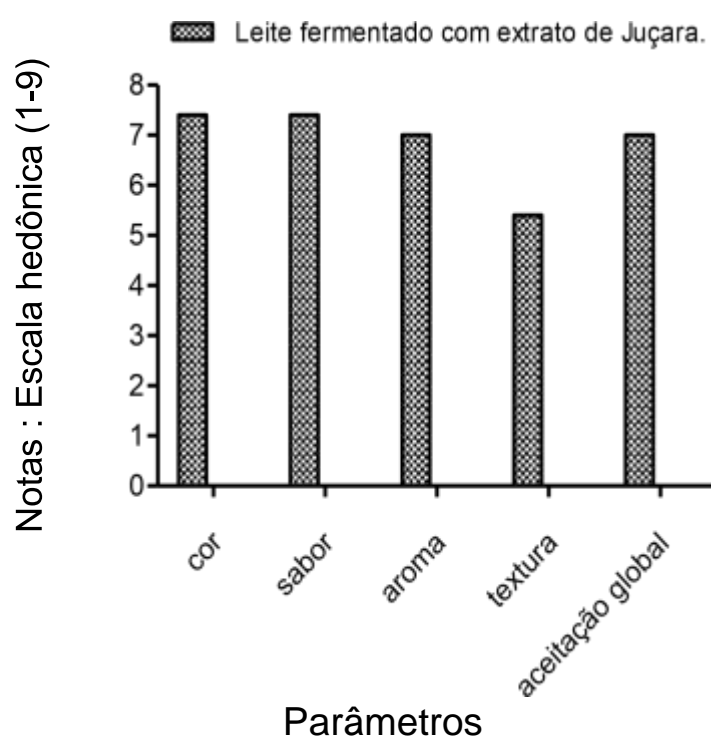
**Fig. 6:** Sobrevivência celular (log de UFC/mL) de *L. reuteri* em leite fermentado e leite fermentado com extrato de juçara no dia 1 após cada etapa da simulação gastrointestinal.

### 3.6. Análise sensorial

Para a avaliação de aceitação do leite fermentado com extrato de juçara utilizouse uma escala hedônica de 9 pontos. Participaram 90 julgadores, de ambos os sexos, dos quais 50 % tinham entre 15 a 25 anos, 41% entre de 25 a 35 anos e 9 % entre 35 a 45 anos. Dentre os julgadores, 97 % relataram o consumo de produtos fermentados, sendo que para 63 % a frequência de consumo é de moderadamente a frequentemente. Em contrapartida apenas 20 % dos provadores conheciam ou já consumiram o fruto juçara, mostrando o quanto este fruto de elevado valor nutritivo e potencial econômico ainda é pouco explorado e divulgado.

Na Fig. 7 encontram-se as notas médias para cada tributo. A aceitação do parâmetro cor foi na média de  $7,4 \pm 1,3$  em que 57 % dos julgadores consideraram esse atributo como gostei muito a gostei extremamente. Sabor e aroma também receberam média de  $7,4 \pm 1,2$  onde 50 % e 61 % respectivamente classificaram esses

atributos “como gostei muito a gostei extremamente”. A textura obteve a menor média  $5,2 \pm 2$  o que corresponde a “não gostei nem desgostei”. Isso pode ser atribuído ao fato de que a quebra do coágulo não foi suficiente e que não houve nenhuma adição de estabilizantes para melhorar este atributo. A consistência foi preferência de apenas 27 % dos provadores.



**Fig. 7.** Avaliação dos atributos sensoriais (escala de 1-9) de leite fermentado com adição de extrato de juçara.

A aceitação global recebeu a média de  $7 \pm 1,1$ , (gostei moderadamente) média semelhante foi atribuída a leites fermentados comerciais testados por Medeiros, Lima, & Moreira (2011), as três marcas testadas receberam as notas  $6,8 \pm 1,57$ ,  $7,2 \pm 1,82$  e  $6,4 \pm 1,54$ . Gutierrez, Zibordi, & Souza (2012) apresentaram valores de aceitação global de  $5,6 \pm 2,3$  a  $7,3 \pm 1,5$  para diversas amostras de leite fermentado comercial

nos sabores de morango e ameixa. Indicando que o produto desenvolvido está de acordo com os encontrados comercialmente.

#### **4. Conclusão**

O leite fermentado funcional com *L. reuteri* com e sem extrato de juçara apresentou características físico-químicas de acordo com a legislação deste tipo de produto e semelhantes aos leites fermentados disponíveis comercialmente, com o adicional de apresentar atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* devido à produção de reuterina. *L. reuteri* foi capaz de manter-se viável durante todo o período de armazenamento. No teste sensorial a aceitação global foi de 70%, indicando que o LFJ possui perfil sensorial satisfatório, utilizando um fruto pouco explorado que pode ser aplicado para o desenvolvimento de um produto funcional, unindo ambos os benefícios e contribuindo para a preservação da espécie.

## Referencias

- Akalin, a S., Gönç, S., & Düzel, S. (1997). Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *Journal of Dairy Science*, *80*(11), 2721–2725. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76233-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76233-7)
- Alexandre, D., Cunha, R. L., & Hubinger, M. D. (2004). Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, *24*(1), 114–119. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000100021>
- Axelsson, L. T., Chungf, T. C., Dobrogosz, W. J., & Lindgrent, S. E. (1989). Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *2*, 131–136. <https://doi.org/10.3109/08910608909140210>
- Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to invitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, *55*(2), 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.015>
- Bertazzoni Minelli, E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., ... Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal*, *14*(8), 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.01.007>
- Buriti, F. C. A., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2010). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *137*(2–3), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.030>
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, *41*(5), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.003>
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., & Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*, *7*, 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-101>
- Costa, G. N. dos S., Mendes, M. F., De Araujo, I. O., & Pereira, C. de S. S. (2012). Desenvolvimento de um logurte Sabor Juçuí ( *Euterpe edulis Martius* ): Avaliação Físico-química e Sensorial. *Revista Eletrônica TECCEN*, *5*(2), 43–58.
- Fernandes, S. de S., Coelho, R. de S., Franco, R. M., Barbosa, C. G., & Luchese, R. H. (2011). monitoramento da microbiota de iogurtes comerciais Microbial Monitoring of Commercial Yoghurts. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 5–11.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Yolou, F. S., & Marchioni, E. (2011). In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *International Dairy Journal*, *21*(2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.006>
- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, *37*(9), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.006>

- Guergoletto, K. B., Costabile, A., Flores, G., Garcia, S., & Gibson, G. R. (2016). In vitro fermentation of ju??ara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*, 196, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>
- Gutierrez, E. M. R., Zibordi, G., & Souza, M. C. de. (2012). Physicochemical and sensorial analysis probiotic yogurts. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67(384), 22–29. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120004>
- Hekmat, S., & Reid, G. (2007). Survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in milk. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(5), 615–619. <https://doi.org/10.1111/j.13652621.2006.01292.x>
- Jakobsen, M., & Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6(8–9), 755–768. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00071-2)
- Langa, S., Landete, J. M., Martín-Cabrejas, I., Rodríguez, E., Arqués, J. L., & Medina, M. (2013). *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. *Food Control*, 33(1), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.035>
- Langa, S., Martín-Cabrejas, I., Montiel, R., Landete, J. M., Medina, M., & Arqués, J. L. (2014). Short communication: Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6116–21. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8306>
- Medeiros, E. J. L. De, Lima, A. R. C. De, & Moreira, R. T. (2011). leite fermentado de marcas comerciais: estudo da aceitação e correlação com ph e acidez Fermented milk trademark: a study of acceptance and correlation with ph and acidity, 46–50.
- Narvhus, J. A., Østeraas, K., Mutukumira, T., & Abrahamsen, R. . (1998). Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00036-1)
- Nejati, R., Gheisari, H., Hosseinzadeh, S., & Amin, H. (2011). Viability of encapsulated *Bifidobacterium lactis* (BB-12) in synbiotic UF cheese and it's survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 6(3–4), 197–204. <https://doi.org/10.1111/14710307.12312>
- Østlie, H. M., Helland, M. H., & Narvhus, J. A. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal*, 14(11), 957–965. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.008>
- Pauli, E. D., Cristiano, V., & Nixdorf, L. (2011). Method for Determination of Carbohydrates Employed in the Selection of Adulterations in, 34(4), 689–694.
- Saarela, M., Lahteenmäki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T. (2002). Gut bacteria and health foods — the European perspective, 78, 99–117.
- Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15(12), 1289–1297. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.008>
- Silva, H. S. da, Ramos, R. J., Cirolini, A., Miotto, M., Bassegio, A. M., & Vleira, C. R. W. (2010). interesse alimentar Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against bacteria of nourishment concern, 69(4), 584–587.

- Splechna, B., Nguyen, T. H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., & Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4999–5006. <https://doi.org/10.1021/jf053127m>
- T., O., & HILL, C. (1999). Bacteriocins Potnial in Foods.Pdf. *Encyclopedia of Food Microbiology.*, 183–197.
- Talarico, T. L., & Dobrogosz, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(5), 674–679. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>.Updated
- Tobajas, M., Mohedano, A. F., Casas, J. A., & Rodríguez, J. J. (2007). A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.017>
- Vollenweider, S., Grassi, G., König, I., & Puhán, Z. (2003). Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3287–3293. <https://doi.org/10.1021/jf021086d>
- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.003>

### **Capítulo 3: Efeito do armazenamento na atividade antioxidante e sobrevivência ao estresse oxidativo de leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR92 e adicionado de extrato de juçara (*Euterpe edulis*)**

#### **Resumo**

Leite fermentado é considerado um alimento funcional quando contém bactérias probióticas e a adição de frutas em sua composição é uma alternativa para a indústria buscar novos sabores que agradem o consumidor. Juçara é fruto da palmeira *Euterpe edulis* Mart., que seu fruto vem se destacando como uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Assim o objetivo deste estudo foi produzir leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e verificar através de testes *in vitro*, durante o período de 30 dias de armazenamento a 4 °C, a capacidade antioxidante e se este exerce efeito protetor à células de *Lactobacillus reuteri* na indução ao estresse oxidativo, em contato com as espécies reativas de oxigênio. Durante o armazenamento, foi observado o escurecimento do produto que inicialmente apresentava uma luminosidade de  $64,25 \pm 0,1$  caindo para  $47,54 \pm 0,21$  ao final de 30 dias. Os fenólicos mantiveram-se estatisticamente estáveis em 3,04 mg EAG/100g. Nos testes de DPPH e FRAP os resultados apresentaram uma queda nos teores de antioxidantes chegando ao final do armazenamento com  $67,03 \pm 1,67$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g e  $830 \pm 9,83$  gTEAC.100 g/mL, respectivamente. Em relação à resistência ao peróxido de hidrogênio, LFJ apresentou uma contagem de 6,0; 5,08 e 4,4 log de UFC/mL nos dias 1, 15 e 30 na devida ordem. Na resistência ao ânion superóxido apenas a partir do 15º dia de armazenamento houve a presença de halo na placa indicando menor efeito protetor da juçara ao microrganismo. Frente ao radical hidroxila, as contagens foram de 5,95; 5,04 e 4,3 log de UFC/ mL de *L. reuteri* nos intervalos de 1, 15 e 30 dias. Desta forma os resultados indicam que a adição de juçara colaborou com o efeito antioxidante do leite fermentado com *L. reuteri*.

**Palavra Chave:** alimento funcional, lácteos, *Euterpe edulis*, antocianinas, fenólicos

## 1. Introdução

A qualidade de um alimento é dependente da satisfação do consumidor, que cada vez mais exigente, torna a funcionalidade que alguns deles podem apresentar, um forte aliado à praticidade e qualidade de vida e, dentre estes se enquadra o leite fermentado. Estudos apresentaram antioxidantes presentes naturalmente no leite e produtos lácteos, tais como aminoácidos (tirosina e cisteína), vitaminas (A e E), carotenóides além de sistemas enzimáticos, representados principalmente por superóxido dismutase e catalase (USTA; YILMAZ-ERSAN, 2013). Outro trabalho demonstra que os fermentados lácteos dispõem de capacidades antioxidantes e que são capazes de reagirem com radicais tais como superóxido, hidroxila e peróxido (VIRTANEN et al., 2007).

Em busca de melhorias a adição de frutas, é um artifício usado pela indústria, que está sempre em busca de novos sabores (OLIVEIRA et al., 2011) A palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) é encontrada na faixa da Mata Atlântica (PIZO; VIEIRA, 2004), e possui importância econômica e ecológica (BARROSO; REIS; HANAZAKI, 2010). Seu principal produto, o palmito, devido a prática extrativista, é responsável pelo desaparecimento da espécie em várias regiões (LORENZI et al. 2004), o que torna seu fruto uma alternativa sustentável à exploração da planta.

O fruto da palmeira juçara é considerado uma "super fruta" rico em nutrientes com alto valor nutricional. Em sua composição, há ácidos graxos tais como oleico e linoleico, lipídeos (18,45-44,08%) e proteínas (5,13-8,21%) (BORGES et al., 2011). Entretanto é seu teor de antioxidantes, principalmente antocianinas, fenólicos e outros flavonoides, responsável por maior interesse neste fruto (SCHULZ et al., 2015).

As antocianinas, grupo de pigmentos de origem vegetal, apresentam muitos benefícios à saúde humana, pois em quantidades adequadas podem proteger as células contra processos degenerativos, agindo em uma possível prevenção de infecções e doenças, promovendo o equilíbrio e a manutenção de metabolismos reparatórios e compensadores, com a função antioxidante (NEVES, 2012). Testes *in vitro* tornaram-se importantes ferramentas na busca por substâncias antioxidantes. Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa da real atividade antioxidante de um composto (OLIVEIRA et al., 2011) Dentre os métodos

mais utilizados estão: fenólicos, capacidade de sequestrar radicais DPPH, capacidade de sequestrar radical livre ABTS+ e capacidade de redução do ferro (FRAP). Uma abrangente definição de antioxidante é “qualquer substância que atrasa ou inibe a oxidação de um substrato oxidável de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995). Esses agentes protegem as células contra os efeitos dos radicais livres, dentre estes as espécies reativas de oxigênio (ERO).

ERO incluem diversas formas de oxigênio ativo, tais como radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH.) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). São subprodutos gerados no organismo por reações biológicas ou através de fatores exógenos (DAR et al., 2011). Muitas doenças crônicas estão relacionadas a um desequilíbrio no sistema redox celular causando um aumento do nível de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (Deiana et al., 2010).

Considerando que o consumo de antioxidantes através da dieta é de grande importância, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante e resistência ao estresse oxidativo de um leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* com e sem a adição de extrato de juçara, durante 30 dias de armazenamento a 4°C.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Microrganismo**

A linhagem de *Lactobacillus reuteri* LR92 (Sacco DSM 26866, Cadorago, Itália) na forma liofilizada, foi mantida em leite na concentração de 0,1% (m/v). Previamente aos ensaios, 1 mL da cultura estoque foi ativada e cultivada a 37° C em condições anaeróbias em leite reconstituído (10% m/v) estéril por 24 horas (LANGA et al., 2013).

### **2.2 Extrato de juçara**

Os frutos de juçara foram colhidos nas safras dos palmiteiros produzidos na Fazenda Bimini (Rolândia, Paraná, Brasil), gentilmente cedidos por Daniel Steidle e sua família.

Para obtenção do extrato, os frutos foram lavados em água corrente e higienizados durante 30 minutos em água contendo cloro a uma concentração de 200 mg / kg. Em seguida, enxaguados e despolidos com água potável na proporção de 2:1 (m / v), utilizando uma batedeira planetária, durante 1 minuto em baixa frequência,

para preservar a viabilidade das sementes. As sementes foram separadas para o plantio e o extrato congelado em frações até a sua utilização (GUERGOLETTTO et al., 2016). Para a utilização, o extrato foi descongelado, filtrado em filtro de tecido sintético para remoção da borra e pasteurizado por 1 minuto a 80° C.

### **2.3 Leite fermentado**

No leite desnatado (Molico<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) (previamente pasteurizado a 95 °C por 5 minutos) com 18 g/L de sólidos totais, foi adicionado 100 mM de glicerol grau alimentício (Arcolor<sup>®</sup>, Brasil) e, inoculados 10 mL/L da cultura de *L. reuteri*. O leite foi incubado em recipientes estéreis e sob anaerobiose à 37 °C até atingir pH de 4,5 (aproximadamente 12 horas). Em seguida acrescentou-se 10 % de sacarose nas amostras, para as amostras de leite com adição de extrato de juçara adicionou-se 50 mL/L de extrato (item 2.2). As amostras permaneceram estocadas a 4 °C por 30 dias em condições anaeróbicas (Adaptado de LANGA et. al., 2013).

### **2.4 Avaliação da composição centesimal**

Para a avaliação da composição centesimal foram determinados os teores de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade em três períodos (1, 15, e 30 dias a 4 °C) de ambas as formulações, seguindo as metodologias descritas pela AOAC (2006). Os carboidratos foram obtidos por diferença.

### **2.5 Medida de cor**

As amostras de leite fermentado (LF) e leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) armazenadas a 4 °C por 1, 15 e 30 dias foram avaliadas quanto à cor, utilizando colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) com iluminante D65. Os valores de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (componente vermelho-verde) e  $b^*$  (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema CIELAB (CALDEIRA et al., 2010).

## **2.6 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante**

As análises foram feitas em triplicata nas amostras de LF e LFJ armazenadas a 4 °C por 1, 15 e 30 dias.

### **2.6.1 Extração da amostra para determinação da capacidade antioxidante**

Para extração das amostras, foi utilizada metodologia descrita por Adom e Liu (2002) e Hung et al. (2009), em que 1 g de amostra liofilizada foi adicionada a etanol 80 % na proporção 1:10, sendo agitadas por 20 minutos a 200 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos e o sobrenadante coletado.

### **2.6.2 Determinação de compostos fenólicos totais**

Para determinação de compostos fenólicos totais, foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1998), com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,9 N, 0,5 mL de carbonato de sódio 7,5 % e 0,5 mL dos extratos das amostras, sendo incubada por 1 hora, em temperatura ambiente, protegido da luz. Após este período foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-visível (765 nm), utilizando como branco à solução de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. A quantificação foi feita pela curva padrão de ácido gálico (4,00 a 16,00 mM) e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico/100 g (EAG) em base seca.

### **2.6.3 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH.**

A capacidade de sequestrar radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), em que 50 µL dos extratos das amostras foram adicionados a 1 mL de tampão acetato (100 mM, pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução de DPPH 250 µM, e armazenados no escuro por 15 minutos, seguindo para leitura em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. Para a quantificação dos extratos foi utilizada curva padrão de Trolox (100 a 1000 µM) e os resultados expressos em µmol de Trolox/g de amostra em base seca.

#### **2.6.4 Capacidade Antioxidante: Capacidade de Sequestrar Radical Livre**

##### **ABTS<sup>•+</sup>**

A capacidade de sequestrar o cátion radical livre ABTS<sup>•+</sup>. (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizada segundo a metodologia descrita por Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005). Aproximadamente 16 horas antes da análise, 5 mL de uma solução de ABTS (7 mM) e 88 µL de persulfato de potássio (2,45 mM) foram misturadas e incubadas por 16 horas em ambiente escuro, para reagirem. Após este período, a solução foi diluída em etanol absoluto até a absorbância  $0,700 \pm 0,020$  a 730 nm. Para a análise, 10 µL dos extratos das amostras foram adicionadas a 4 mL da solução diluída de ABTS<sup>•+</sup> e persulfato e incubados por 6 minutos. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro UV-visível a 730 nm e quantificada com base na curva padrão de Trolox (100 a 2000 µM), sendo os resultados expressos em µmol de Trolox/ g de amostra em base seca.

#### **2.6.5 Capacidade Antioxidante: Capacidade de redução do ferro (FRAP)**

Para determinar a capacidade antioxidante através da redução do ferro foi realizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1998). O reagente de FRAP foi preparado da seguinte forma: 2,5 mL de uma solução 10 mM TPTZ em HCl 40 mM, 2,5 mL de 20 mM cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) e 25 mL de 0,3 mM tampão acetato e pH 3,6. A solução ficou incubada a 37 °C por 30 minutos. Para a avaliação da atividade antioxidante, 900 µL do reagente FRAP preparado previamente, foi misturado com 90 µL de água destilada e 30 µL da amostra ou padrão. As amostras foram incubadas à 37 °C, por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm. Para a calibração foram utilizadas soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mM). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em g equivalente Trolox por 100 g amostra (gTEAC.100 g/mL).

#### **2.7 Resistência às espécies reativas de oxigênio (ERO)**

Para análise do estresse oxidativo, foram utilizadas as amostras LF e LFJ. Os testes realizados para resistência às ERO foram: resistência ao peróxido de

hidrogênio, ânions superóxido e radical hidroxila, por metodologia descrita por Kullisaar et al. (2002) com modificações descritas a seguir.

### **2.7.1. Resistência ao peróxido de hidrogênio**

A resistência de células de *Lactobacillus reuteri* ao peróxido de hidrogênio foi realizada através da suspensão de 1mL das amostras, em 9mL de água peptonada (0,1%) e incubado com 1,5 mM de peróxido de hidrogênio (50 m/v solução em água, Biotec, Brasil), a 30 °C por 6 horas. Em intervalos de tempo de 2 horas, alíquotas foram retiradas e plaqueadas em ágar MRS, incubadas a 37 °C por 48 horas em anaerobiose e o número de células viáveis foi obtido.

### **2.7.2 Resistência ao ânion superóxido**

A resistência aos ânions superóxido foi induzida pelo paraquat (1,1V-22 dimethyl-4,4V-bipyridinium) (36541, Fluka). As amostras foram suspensas em solução de água peptonada (0,1%) e desta solução 0,1mL de suspensão de células foi plaqueadas em ágar MRS. Um disco de papel foi colocado no centro da placa de ágar embebido com 10 µL de solução de paraquat 10 mM em água estéril, incubado a 37 °C por até 48 horas. A zona de inibição do crescimento (mm) foi medida com paquímetro.

### **2.7.3 Resistência ao radical hidroxila**

O leite fermentado (1 mL), em água peptonada (0,1%), foi exposto aos radicais hidroxila gerados através de uma reação contendo solução de ácido tereftálico 10 mM (ácido 1,4-benzenodicarboxílico) em tampão fosfato e 0,01 mM de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , sendo a reação iniciada pela adição de 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Em intervalos de tempo de 2 horas, durante 6 horas, o número de células viáveis foi estimado em UFC nas placas contendo MRS.

## 2.8 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata genuína, sendo aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação de médias no nível de 5 % de significância utilizando o programa Statistica 10 (StatSoft® Inc, 2011).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Composição Centesimal

Os resultados das análises da composição centesimal nas formulações LF e LFJ durante 1,15 e 30 dias de armazenamento são apresentados na Tabela 1.

Os valores encontrados nas análises estão de acordo com os da literatura. Ramos et al. (2013) publicaram valores semelhantes: umidade de 81%, lipídeos: 0,42 %, Carboidratos: 15 %. Os teores de proteínas deste trabalho estão maiores em comparação a Ramos, (em média 3,58 % contra 1,55%) valores que podem ser justificados devido a suplementação de 8% (com total de 18% de sólidos desengordurados de leite) ao produto desenvolvido em nosso trabalho. A adição de extrato de juçara não ocasionou diferenças significativas na quantidade de proteínas em LF e LFJ.

**Tabela 1:** Composição centesimal de leite fermentado (LF) e leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) durante 30 dias de armazenamento (4°C) em 100g

Amostras	LF			LFJ		
	Dia 1	Dia 15	Dia 30	Dia 1	Dia 15	Dia 30
<b>Proteínas</b>	3,05 <sup>b</sup> ± 0,0	3,47 <sup>b</sup> ± 0,0	4,22 <sup>a</sup> ± 0,0	3,47 <sup>b</sup> ± 0,0	3,48 <sup>b</sup> ± 0,0	3,56 <sup>b</sup> ± 0,0
<b>Lipídeos</b>	0,30 <sup>b</sup> ± 0,0	0,30 <sup>b</sup> ± 0,0	0,31 <sup>b; a</sup> ± 0,0	0,33 <sup>a; b</sup> ± 0,0	0,31 <sup>a; b</sup> ± 0,0	0,34 <sup>a</sup> ± 0,0
<b>Carboidratos</b>	14,5 <sup>f</sup> ± 0,1	16,03 <sup>c</sup> ± 0,0	17,8 <sup>a</sup> ± 0,0	13,59 <sup>e</sup> ± 0,0	15,18 <sup>d</sup> ± 0,0	17,1 <sup>b</sup> ± 0,0
<b>Umidade</b>	82,1 <sup>a; b</sup> ± 0,0	80,20 <sup>c</sup> ± 0,0	77,67 <sup>e</sup> ± 0,0	82,61 <sup>a</sup> ± 0,0	81,03 <sup>b; c</sup> ± 0,0	79,00 <sup>d</sup> ± 0,0

1- Médias seguidas de mesma letra minúsculas na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

### 3.2 Cor

A análise do parâmetro cor apresentou diferentes perfis entre as amostras LF e LFJ (Tabela 2). Estas diferenças são devido a adição do extrato de juçara, rico em antocianinas, que após a clorofila, é o mais significativo grupo de pigmentos de origem vegetal (TIMBERLAKE, 1993).

**Tabela 2:** Parâmetros L\*, a\* e b\* para o Leite Fermentado (LF) e Leite Fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) durante o armazenamento por 30 dias à 4°C

Amostras	Leite Fermentado			Leite Fermentado + juçara		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
<b>Dia 1</b>	80,27±0,7 <sup>a</sup>	-2,78± 0,2 <sup>c</sup>	8,73±0,1 <sup>a</sup>	64,25± 0,1 <sup>a</sup>	5,63±0,3 <sup>a</sup>	4,91±0,3 <sup>c</sup>
<b>Dia 15</b>	80,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	-1,81 ±0,3 <sup>b</sup>	6,93±0,5 <sup>b</sup>	62,45±0,1 <sup>b</sup>	3,43±0,1 <sup>b</sup>	5,81±0,05 <sup>b</sup>
<b>Dia 30</b>	80,0± 2,14 <sup>a</sup>	-1,51 ±0,8 <sup>a</sup>	5,7±0,08 <sup>c</sup>	47,54±0,2 <sup>c</sup>	1,57±0,0 <sup>c</sup>	6.05±0,6 <sup>a</sup>

\*Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

No período do armazenamento, o parâmetro de luminosidade L\*(0 = Preto e 100 = Branco) mostrou-se constante para a amostra LF, que é mais clara em comparação a amostra LFJ. Para a amostra com juçara, foi observada uma diminuição nos parâmetros de luminosidade que a princípio era de 64,25 e, ao final de 30 dias, chegou a 47,54 o que indica um escurecimento da amostra (Hunter Laboratories, 2012). Esta redução da luminosidade pode ser relacionada a degradação de antocianinas e cianidinas, presentes no extrato de juçara, por oxidação e também através da ação da enzima polifenoloxidase resultando em produtos de degradação que afetaram diretamente a luminosidade (SRIVASTAVA et al. 2007).

Em relação ao parâmetro a\* (coordenadas vermelho e verde), LF apresentou valores negativos para todas as análises, indicando coloração próxima ao verde. Já LFJ apresentou números positivos indicando a coloração vermelha, que pode ser justificado pela presença de cianidina, uma antocianina presente em grandes concentrações na juçara, e é um pigmento de coloração homóloga ao vermelho CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; COSTA et al., 2004). Neste parâmetro durante o armazenamento, foi observada alteração significativa, sendo mais um indício da degradação deste pigmento.

É possível observar de acordo com b\* (coordenadas azul e amarelo), que ambas as amostras possuem valores positivos, indicando uma tendência a coloração

amarela, devido ao  $\beta$ -caroteno presente no leite (PELLEGRINI et al., 2012). Na amostra LFJ, este parâmetro ao contrário dos outros, apresentou um aumento em seus valores, aumento também observado por Leite (2015) que ao analisar iogurte adicionado de 5 % de polpa de juçara apresentou no primeiro dia de armazenamento o valor 1,5 chegando a 5,3 ao final de 28 dias de armazenamento.

Um importante atributo de qualidade é a cor dos alimentos, servindo de base para a identificação e aceitação, influenciando na percepção dos demais atributos sensoriais (OLIVEIRA et al., 2011). As antocianinas presentes no extrato de juçara utilizado neste estudo, são pouco estáveis sofrendo diversos mecanismos durante o processamento e armazenamento de alimentos acarretando alterações na cores e perdas de coloração (FRANCIS; MARKAKIS, 2009).

### **3.2 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante**

Observa-se na Tabela 3 que as amostras LFJ apresentaram em média 44 % a mais de teor de compostos fenólicos em comparação com as amostras LF. Inicialmente LF apresentou  $1,66 \pm 0,17$  contra  $3,04 \pm 0,07$  de teor de compostos fenólicos da amostra LFJ. Esta variação está de acordo com Leite (2015) em que no iogurte com 5% de polpa de juçara apresentou teor de fenólicos 43% maior do que a amostra sem adição de polpa. Ambas as amostras mantiveram-se estáveis durante o armazenamento.

**Tabela 3:** Fenólicos totais e atividade antioxidante do leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF) durante 30 dias de armazenamento a 4°C.

Amostras	Fenólicos Totais (mg EAG/ 100g)	DPPH ( $\mu\text{mol}$ de Trolox/g)	ABTS·+ ( $\mu\text{mol}$ de Trolox/g)	FRAP gTEAC.100 g/mL
LF 1	1,66 <sup>b</sup> $\pm$ 0,17	21,90 <sup>c</sup> $\pm$ 5,00	3,38 <sup>a</sup> $\pm$ 1,69	235,77 <sup>d</sup> $\pm$ 9,8
LF 15	1,41 <sup>b</sup> $\pm$ 0,24	23,03 <sup>c</sup> $\pm$ 0,09	3,37 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	229,87 <sup>d</sup> $\pm$ 9,7
LF 30	1,51 <sup>b</sup> $\pm$ 1,26	24,50 <sup>c</sup> $\pm$ 1,88	3,39 <sup>a</sup> $\pm$ 0,001	229,87 <sup>d</sup> $\pm$ 9,1
LFJ 1	3,04 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	83,92 <sup>a</sup> $\pm$ 4,00	3,37 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	1185,64 <sup>a</sup> $\pm$ 4,2
LFJ 15	3,03 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	73,86 <sup>a,b</sup> $\pm$ 4,15	3,37 <sup>a</sup> $\pm$ 1,68	1062,05 <sup>b</sup> $\pm$ 4,9
LFJ 30	2,81 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	67,03 <sup>b</sup> $\pm$ 1,67	3,38 <sup>a</sup> $\pm$ 0,003	830,00 <sup>c</sup> $\pm$ 9,83

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Os fenólicos dos frutos de *E. edulis*, segundo Borges et al. (2011), são principalmente compostos por quercetina (29% do conteúdo total) e ácido gálico (31%). Os compostos fenólicos quantificados nos alimentos são altamente influenciados por fatores tais como: método de extração, natureza química, presença de substâncias interferentes, tempo e condições de armazenamento, justificando as variações encontradas no conteúdo de fenólicos totais na literatura (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Em relação a análise de sequestro radical por DPPH é possível observar que as amostras de LF não apresentaram variações ( $p < 0,05$ ) durante o período de armazenamento ficando em média 23,12  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g, as quais foram inferiores às amostras contendo extrato de juçara (LFJ) (83,92  $\pm$  4,00 a 67,03  $\pm$  1,67  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g). A quantificação de antioxidantes pelo método DPPH baseia-se na quantidade de moléculas deste composto que é reduzida na presença de grupos hidroxilas (MENSOR et al., 2001) presentes no alimento, a degradação das antocianinas pode gerar melaninas compostos que não possuem grupos hidroxilas, reduzindo esta reação e consequentemente a sua quantificação.

Foi observado que o tempo de armazenamento influenciou a atividade antioxidante das amostras LFJ. Este fato pode ser atribuído à degradação das antocianinas, que estão entre os principais compostos com atividade antioxidante presentes no fruto juçara. Este resultado pode ser relacionado ao parâmetro de luminosidade apresentado anteriormente que sugere indícios de degradação deste composto (UNDERHILL, 1992).

Não houve diferença estatística entre amostras LF e LFJ para o padrão ABTS·+ e ambos apresentaram em média  $3,38 \pm 0,008$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g. A determinação da atividade antioxidante por ABTS·+ é dependente do tempo de incubação, do método assim como da quantidade de amostra quantificada (EVANS et al, 1996). Os métodos DPPH e ABTS quantificam compostos diferentes por isso a importância de se utilizar mais de um método de determinação.

A atividade antioxidante medida através da capacidade de redução do ferro (FRAP), apresentou a mesma tendência que DPPH. Em relação as amostras LF não houve alteração neste parâmetro durante o armazenamento ficando em média 232 gTEAC.100 g/mL. A amostras LFJ tem 5 vezes mais capacidade de redução do ferro do que a amostra LF, porém esta capacidade inicial de  $1185,64 \pm 4,2$  gTEAC.100 g/mL foi reduzida a  $830 \pm 9,83$  ao final de 30 dias de armazenamento.

### **3.3 Testes de resistência às espécies reativas de oxigênio (ERO)**

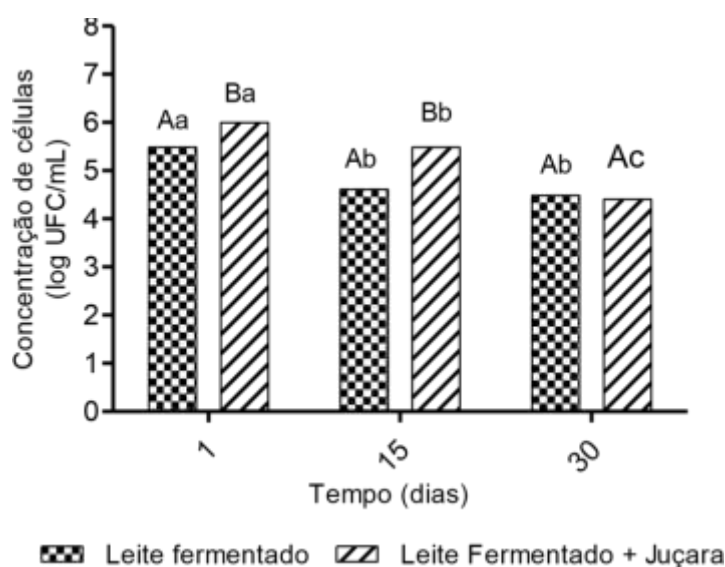
#### **3.3.1 Resistência ao peróxido de hidrogênio**

A resistência do *L. reuteri* em leite fermentado com e sem extrato de juçara está apresentada na Figura 1.

*L. reuteri* mostrou-se resistente ao peróxido de hidrogênio durante 6 horas em ambas amostras. Kaizu et al., (1993); Peuhkuri, (1996) demonstraram que alguns lactobacilos possuem atividade antioxidante e são capazes de diminuir o acúmulo de ERO durante a ingestão de alimentos.

Entretanto as amostras LF e LFJ apresentaram comportamento distintos. Até o 15º dia do período de armazenamento a amostra com extrato de juçara possivelmente exerceu um efeito protetor nas células de *L. reuteri* em comparação às amostras sem a adição do extrato frente ao estresse gerado por 1,5 mM de peróxido de hidrogênio,

devido a presença das antocianinas no extrato. Após esse período, coincidentemente com a queda da atividade antioxidante por FRAP, não houve mais proteção.



**Figura 1:** Concentração de *L. reuteri* em presença de 1,5 mM de peróxido de hidrogênio, após incubação de 6 horas.

\*Letra maiúsculas diferentes em mesmo tempo, diferem entre si a 5% de significância. Letras minúsculas em tempos diferentes, diferem entre si a 5% de significância para uma mesma formulação.

O peróxido de hidrogênio possui toxicidade relacionada com a produção de radicais hidroxila extremamente reativos (PLATENIK et al., 2001). Novello (2011) alega que a atividade antioxidante das antocianinas protege contra a formação dos radicais livres, que quando atingem as células e tecidos causam injurias oxidativas.

Conforme descrito anteriormente durante o período de armazenamento as amostras de LFJ sofreram alterações em relação aos parâmetros cores e atividade antioxidante, provavelmente devido à degradação das antocianinas. Fato que também foi observado quanto à resistência ao peróxido de hidrogênio (Tabela 4). Ao final de seis horas no dia 1 de armazenamento da amostra LFJ houve redução de 1 log UFC.g/mL de *L.reuteri*, já ao final de 30 dias a redução foi de 1,58 log de UFC.g/mL do microrganismo, igualando ao resultado de 30 dias da amostra sem o extrato de juçara.

A amostra LF manteve um mesmo padrão de resistência durante os 30 dias.

**Tabela 4:** Resistência de *L. reuteri in vitro* ao peróxido de hidrogênio em leite fermentado com extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF)

Amostras	LFJ			LF		
	<i>L. reuteri</i> log UFC / mL			<i>L. reuteri</i> log UFC / mL		
Tempo (horas)	Dia 1	Dia 15	Dia 30	Dia 1	Dia 15	Dia 30
0 (Sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	7,0 <sup>Aa</sup> ± 0,01	6,8 <sup>Aa</sup> ± 0,1	6,2 <sup>Ba</sup> ± 0,2	7,0 <sup>Aa</sup> ± 0,01	6,7 <sup>Aa</sup> ± 0,05	6,0 <sup>Ba</sup> ± 0,01
0	6,7 <sup>Aa</sup> ± 0,01	5,85 <sup>Cb</sup> ± 0,03	5,84 <sup>ca</sup> ± 0,01	6,51 <sup>Ba</sup> ± 0,05	5,84 <sup>Ca</sup> ± 0,0	5,84 <sup>Ca</sup> ± 0,0
2	6,0 <sup>Bb</sup> ± 0,06	5,08 <sup>Ec</sup> ± 0,05	5,48 <sup>Db</sup> ± 0,02	6,19 <sup>Aa,b</sup> ± 0,1	5,69 <sup>Cb</sup> ± 0,0	5,7 <sup>Cb</sup> ± 0,01
4	6,0 <sup>Ab</sup> ± 0,00	5,08 <sup>Bc</sup> ± 0,05	4,4 <sup>Ec</sup> ± 0,0	6,03 <sup>Ab</sup> ± 0,05	5,0 <sup>Cc</sup> ± 0,06	4,69 <sup>Dc</sup> ± 0,06
6	6,0 <sup>Ab</sup> ± 0,00	5,08 <sup>Cc</sup> ± 0,05	4,4 <sup>Ec</sup> ± 0,01	5,47 <sup>Bc</sup> ± 0,0	4,6 <sup>Dd</sup> ± 0,02	4,47 <sup>Ed</sup> ± 0,0

\* Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Resistência ao ânion superóxido

As bactérias produtoras de ácido láctico podem degradar ânions superóxidos e peróxidos de hidrogênio (KORPELA et al., 1997). Neste estudo a capacidade das células de *L. reuteri* em resistir aos ânions superóxido não foi investigada (sem a presença de leite ou juçara) porém frente a estes radicais a amostra LFJ protegeu melhor o microrganismo em todos os tempos de armazenamento (Tabela 5) comparada a amostra LF. Gaulejac, Glories e Vivas, (1999) avaliando a atividade sequestradora do radical superóxido, em vinho tinto que habitualmente é atribuída aos taninos, descobriu que esta capacidade também é relacionada às antocianinas presentes nesta bebida.

Esta proteção que a antocianina exerceu frente ao ânion superóxido na amostra LFJ também sofreu redução durante a estocagem, inicialmente não apresentando halo de inibição no primeiro dia, porém estando presente a partir do 15º dia, medindo 11 mm, repetindo o mesmo resultado ao final de 30 dias. Em 30 dias

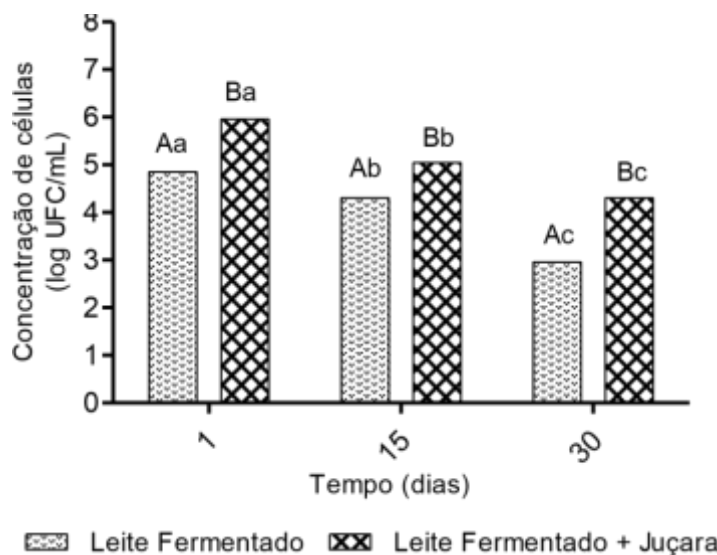
também houve aumento do halo na amostra LF, assim como uma menor densidade celular na placa.

**Tabela 5** Resistência ao ânion superóxido em leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF) durante 30 dias de armazenamento à 4°C.

Tempo (dia)	Halo mm	
	LFJ	LF
1	Sem halo	8
15	11	21
30	11	21

### 3.3.3 Resistência ao radical hidroxila

A adição de extrato de juçara ao leite fermentado mostrou resultados positivos também em relação à resistência ao radical hidroxila em comparação ao leite fermentado sem o extrato conforme apresentado na Figura 2 e Tabela 6.



**Figura 2:** Concentração de *L. reuteri* em presença de radical hidroxila gerado pela presença de 1 mM de peróxido de hidrogênio, após período incubação de 6 horas.

\*Letra maiúsculas em relação ao tempo, são diferentes a 5% de significância.

Letras minúsculas em amostras, são diferentes a 5% de significância.

É possível observar que o armazenamento interferiu na proteção que o extrato de juçara tem em relação ao *L. reuteri*. Inicialmente (1 dia) a queda no número de

células viáveis após seis horas foi de 1 log UFC / mL, porém em 30 dias a queda foi de 1,7 log UFC / mL. Mesmo com esta redução da taxa de sobrevivência de *L. reuteri* citada acima, ao final do período de 30 dias a resistência do microrganismo foi estatisticamente maior na amostra LFJ que para a mostra LF nas mesmas condições (tabela 6).

A eficiência protetiva frente a agentes de estresse oxidativos (tais como radical hidroxila) das antocianinas depende de sua estrutura química, do grau de glicosilação e do número de grupos hidroxilas (ROSSO et al., 2008), que podem ser reduzidos durante sua degradação, diminuindo seu poder antioxidante. Entretanto o fruto juçara apresenta compostos tais como quercetina e rutina que também contribuem para sua capacidade antioxidante, (SCHULZ et al., 2015), conseqüentemente mesmo com a degradação das antocianinas durante o armazenamento a adição do extrato de juçara possuiu outros componentes que auxiliam na proteção contra os agentes de estresse oxidativos.

Outro estudo aponta o efeito do fruto juçara frente ao estresse oxidativo. Borges et al. (2011) descrevem em seu trabalho que os extratos de juçara (1,5, 4,5 e 9 µg mL/mL) tiveram um efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo gerado por TBH (t-Butyl Hydroperoxide) em células Vero.

**Tabela 6:** Resistência do *L. reuteri* ao radical hidroxila em leite fermentado com adição de extrato de juçara (LFJ) e leite fermentado (LF) durante 30 dias de armazenamento a 4°C

Amostras	<i>L. reuteri</i> log UFC / MI					
	LFJ			LF		
Tempo (horas)	Dia 1	Dia 15	Dia 30	Dia 1	Dia 15	Dia 30
0 (Sem OH <sup>-</sup> )	7,0 <sup>Aa</sup> ± 0,01	6,8 <sup>Aa</sup> ± 0,1	6,2 <sup>Ba</sup> ± 0,2	7,0 <sup>Aa</sup> ± 0,01	6,7 <sup>Aa</sup> ± 0,05	6,0 <sup>B,a</sup> ± 0,01
0	6,0 <sup>A,b</sup> ± 0,03	5,2 <sup>C,b</sup> ± 0,29	4,8 <sup>E,b</sup> ± 0,01	6,2 <sup>B,b</sup> ± 0,0	5,0 <sup>D,b</sup> ± 0,0	3,8 <sup>F,b</sup> ± 0,01
2	6,0 <sup>A,b</sup> ± 0,06	5,2 <sup>C,b</sup> ± 0,00	4,5 <sup>E,b,c</sup> ± 0,01	5,5 <sup>B,c</sup> ± 0,0	4,9 <sup>D,b</sup> ± 0,01	3,8 <sup>F,c</sup> ± 0,0
4	6,0 <sup>A,b</sup> ± 0,00	5,1 <sup>C,b</sup> ± 0,00	4,3 <sup>E,c</sup> ± 0,0	5,5 <sup>B,c</sup> ± 0,01	4,6 <sup>D,c</sup> ± 0,01	3,3 <sup>F,c</sup> ± 0,02
6	5,95 <sup>A,b</sup> ± 0,00	5,04 <sup>B,b</sup> ± 0,05	4,3 <sup>D,c</sup> ± 0,0	4,84 <sup>C,d</sup> ± 0,0	4,3 <sup>D,c</sup> ± 0,0	2,95 <sup>E,c</sup> ± 0,0

\* Médias com letras Maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Conclusão

A adição de extrato de juçara ao leite fermentado foi responsável por um aumento nos conteúdos de fenólicos e antioxidantes, assim como conferiu uma cor característica ao produto. O extrato de juçara também exerceu um efeito protetor às células de *L. reuteri* contra as espécies reativas de oxigênio, aumentando sua viabilidade durante os testes, se comparado com as células do leite fermentado sem o extrato.

Durante o armazenamento houve o escurecimento do leite fermentado adicionado de extrato de juçara, assim como uma queda nos teores de antioxidantes e proteção ao estresse oxidativo. Por isso novos estudos avaliando a adição de substâncias ou embalagens que protejam esses compostos da degradação são necessários.

## REFERÊNCIAS

- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.
- AKALIN, A S.; GÖNÇ, S.; DÜZEL, S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 11, p. 2721–2725, 1997.
- AXELSSON, L. T. *et al.* Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 2, p. 131–136, 1989.
- BARROSO, R. M.; REIS, A.; HANAZAKI, N. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe edulis Martius*) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 518–528, 2010.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1995, p. 15–27, 1998.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CALDEIRA, L. A. *et al.* Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2193–2198, 2010.
- CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 539–543, 2008.
- CLEUSIX, V. *et al.* Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. **BMC microbiology**, v. 7, p. 101, 2007.
- COSTA, G. N. DOS S. *et al.* Desenvolvimento de um iogurte Sabor Juçai (*Euterpe edulis Martius*): Avaliação Físico-química e Sensorial. **Revista Eletrônica TECEN**, v. 5, n. 2, p. 43–58, 2012.
- COSTA, Z. G.; COSTA, C. M. L. Estabilidade antocianinas extraídas dos frutos de açai (*Euterpe oleracea Mart.*). 2004.
- DAR, M. Y. *et al.* Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1606–1611, 2011.
- DEIANA, M. *et al.* Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 3008–3016, 2010.
- FERNANDES, S. DE S. *et al.* Monitoramento da microbiota de iogurtes comerciais Microbial Monitoring of Commercial Yoghurts. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, p. 5–11, 2011.

FRANCIS, F. J.; MARKAKIS, P. C. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** **Food colorants : Anthocyanins**. [s.l: s.n.]. v. 28

GAULEJAC, N. S. DE; GLORIES, Y.; VIVAS, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v. 32, p. 327–333, 1999.

GBASSI, G. K. *et al.* In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 97–102, 2011.

GUEIMONDE, M. *et al.* Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, n. 9, p. 839–850, 2004.

GUERGOLETTO, K. B. *et al.* In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, p. 251–258, 2016.

GUTIERREZ, E. M. R.; ZIBORDI, G.; SOUZA, M. C. DE. Physicochemical and sensorial analysis probiotic yogurts. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 22–29, 2012.

HUNG, P. VAN *et al.* Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 185–190, 2009.

HUNTER LABORATORIES. **Measuring Color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L\*a\*b\***. Disponível em: <<https://www.hunterlab.com/an1005b.pdf>>. Acesso em: 7 mar. 2017.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 8–9, p. 755–768, 1996.

KAIZU, H. *et al.* Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 9, p. 2493–9, 1993.

KULLISAAR, T. *et al.* Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 215–224, 2002.

LANGA, S. *et al.* *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 200–206, 2013.

LANGA, S. *et al.* Short communication: Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 10, p. 6116–21, 2014.

LEITE, S. T. Universidade Federal do Espírito Santo. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos. Iogurte simbiótico de açaí (*Euterpe edulis* Mart.): caracterização físico-química e viabilidade de bactérias lácticas e probiótica. a. 2015.

LORENZI, H.; *et al.* Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, v. 32, n. 3, p. 416, 2004.

- LUCIANA L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.
- MEDEIROS, E. J. L. DE; LIMA, A. R. C. DE; MOREIRA, R. T. Fermented milk trademark : a study of acceptance and correlation with ph and acidity. p. 46–50, 2011.
- MENEZES RAMOS, A. C. S. DE *et al.* Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2817–2828, 2013.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.
- NARVHUS, J. A. *et al.* Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 73–80, 1998.
- NEJATI, R. *et al.* Viability of encapsulated *Bifidobacterium lactis* (BB-12) in synbiotic UF cheese and it's survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 6, n. 3–4, p. 197–204, 2011.
- NEVES, L. C. Frutos - O Remédio do futuro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 957–1306, 2012.
- NOVELLO, A. A. Extração de antocianinas dos frutos do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis Martius*) e sua atuação nas atividades antioxidantes e antiaterogênica em camundongos APOE - / -. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- OLIVEIRA, P. D. DE *et al.* AVALIAÇÃO SENSORIAL DE IOGURTE DE AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA MART) TIPO “ SUNDÆ ” Sensory evaluation of the açaí yoghurt ( euterpe oleracea mart ) type sundae. p. 5–10, 2011.
- ØSTLIE, H. M.; HELLAND, M. H.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 11, p. 957–965, 2003.
- PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, L. Method for Determination of Carbohydrates Employed in the Selection of Adulterations in. v. 34, n. 4, p. 689–694, 2011.
- PELLEGRINI, L. G. DE *et al.* **Características físico-químicas e cor instrumental de ricota fresca de leite de cabra.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2012.
- PEUHKURI, K. et al. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG measured as prostacyclin and nitric oxide production in endothelial cell culture. **Nutrition Today**, v. 31, p. 995–996, 1996.
- PIZO, M. A; VIEIRA, E. M. Palm harvesting affects seed predation of *Euterpe edulis*, a threatened palm of the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 64, n. 3B, p. 669–676, 2004.

- PLATENIK, J. *et al.* Quinolinic acid-iron(ii) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction. **Free Radic Res**, v. 34, n. 5, p. 445–59., 2001.
- R KORPELA, *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 503–505, 1997.
- SAARELA, M. *et al.* Gut bacteria and health foods — the European perspective. v. 78, p. 99–117, 2002.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 133–139, 2005.
- SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1289–1297, 2005.
- SCHULZ, M. *et al.* Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis Martius*) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, 2015.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315–1321, 1995.
- SILVA CAMPELO BORGES, G. DA *et al.* Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2128–2133, 2011.
- SRIVASTAVA, A. *et al.* Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2705–2713, 2007.
- TALARICO, T. L.; DOBROGOSZ, W. J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 5, p. 674–679, 1989.
- TIMBERLAKE, C. F. Reviews The Flavonoids-Advances in Research. **Book Reviews The**, p. 996, 1993.
- TOBAJAS, M. *et al.* A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 218–225, 2007.
- UNDERHILL, S. J. R. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp browning: A review. **Tropical Science**, v. 32, p. 305–312, 1992.
- USTA, B.; YILMAZ-ERSAN, L. Antioxidant Enzymes of Milk and Their Biological Effects Sütün Antioksidan Enzimleri ve Biyolojik Etkileri. **Journal of Agricultural Faculty of Uludag University**, v. 27, n. September 2013, p. 123–130, 2013.
- VERA DE ROSSO, V. *et al.* Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea Mart.*) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291–299, 2008.

VIRTANEN, T. *et al.* Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 106–115, 2007.

VOLLENWEIDER, S. *et al.* Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3287–3293, 2003.

WANG, C. Y. *et al.* Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. **Anaerobe**, v. 16, n. 6, p. 578–585, 2010.

## CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento de leite fermentado com *L. reuteri* com e sem extrato de juçara apresentou características físico-químicas de acordo com a legislação deste tipo de produto com pH de 4,5 e acidez titulável de 1,1. *L. reuteri* foi capaz de multiplicar-se no produto e manter-se viável durante todo o período de armazenamento com queda de 1 ciclo log durante os 30 dias analisados (de 7 log de UFC/mL para 6 log de UFC/mL). Os níveis de ácido láctico não foram afetados pela presença de extrato de juçara durante o período de armazenamento. Em relação ao açúcar a presença do fruto acrescentou ao produto frutose.

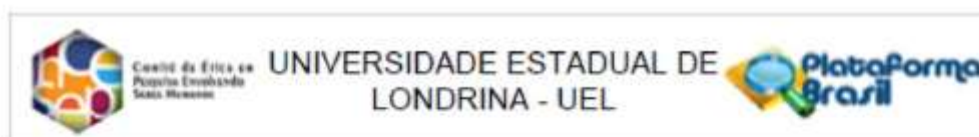
Possivelmente as condições de fermentação em anaerobiose e na presença de glicerol proporcionou a produção de reuterina, este metabolito também foi capaz de inibir o crescimento de duas cepas de *S. aureus* (ATCC 29231 e N315) demonstrado por presença de halos de inibição.

Ao analisar os parâmetros de leite fermentado com extrato de juçara e compara-los com um leite fermentado sem extrato do fruto, nas mesmas condições de produção, foi possível observar uma melhora nas características funcionais pois houve um aumento em sua capacidade antioxidante, assim como este exerceu um maior efeito protetor para as células de *L. reuteri* frente ao estresse oxidativo. O extrato também conferiu uma cor característica ao produto. Durante o armazenamento houve o escurecimento do leite fermentado adicionado de extrato de juçara, assim como uma queda nos teores de antioxidantes e proteção ao estresse oxidativo, sendo necessário novos estudos para garantir melhor proteção aos compostos degradados.

No teste sensorial de LFJ a aceitação global foi de 70%, demonstrando um perfil sensorial satisfatório, utilizando um fruto pouco explorado que pode ser aplicado para o desenvolvimento de um produto funcional. Concluindo-se que o desenvolvimento de leite fermentado com adição de extrato de juçara é uma alternativa viável para a utilização do fruto, além de um potencial alimento funcional, com fonte de antioxidantes que podem proporcionar efeitos benéficos para a saúde dos consumidores.

ANEXOS

## Anexo 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UEL



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Leite fermentado com adição de Extrato de Juçara.

**Pesquisador:** Sandra Garcia

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 58247516.5.0000.5231

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.084.498

## Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado que propõem desenvolver um produto lácteo fermentado por *Lactobacillus reuteri*, com adição de extrato de juçara, probiótico com capacidade antioxidante. Este produto será submetido à análise sensorial realizada por 100 indivíduos.

## Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Produzir leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR 92 (Sacco) e DMS 4 17938 (ProVance) com adição de extrato de juçara e verificar a produção de compostos antagonísticos frente a contaminantes patogênicos e deteriorantes.

Objetivo Secundário:

Produzir leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* LR 92 (Sacco) e DMS 17938 (ProVance) com adição de extrato de juçara;

Determinar a composição centesimal, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, resistência ao estresse oxidativo do produto com e sem adição de extrato de juçara, e após armazenamento à 4 °C nos tempos 1, 15, 30 e 45 dias;

Determinar a inibição de culturas Gram-positivas, Gram-negativas e de fungo toxigênico;

Determinar a aceitabilidade do produto desenvolvido através de análise sensorial.

**Endereço:** LABECC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-5455

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep266@uel.br



Centro de Ética em  
Pesquisa Avaliada  
Sobre Alimentos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.684.498

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

A pesquisadora afirma que serão utilizadas amostras de extrato de polpa de "juçara" (*Euterpe edulis*) sendo fornecidas apenas após a garantia de ausência de patógenos e a cultura probiótica será composta de linhagens comerciais que são utilizadas por indústrias de alimentos, ainda segundo a pesquisadora "raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais como dores e flatulência e caso ocorra qualquer tipo de desconforto, o julgador será prontamente atendido e amparado pelo pesquisador responsável".

**Benefícios:** A pesquisadora afirma que "o produto apresentado possui efeitos benéficos como a diminuição no tempo de trânsito intestinal e auxílio na prevenção de doenças crônicas".

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

##### **Quanto à seleção**

**Critério de Inclusão:** serão selecionados 100 indivíduos, entre alunos e funcionários da UEL maiores de dezoito anos, saudáveis de ambos os sexos.

**Critério de Exclusão:** Diabéticos

##### **Quanto a intervenção**

A avaliação sensorial do produto será realizada em cabines individuais, com luz branca, as amostras serão servidas em quantidades padronizadas (aproximadamente 20 g), refrigeradas  $10 \pm 2$  °C, codificadas com números aleatórios. Para todas as amostras será assegurada a inocuidade sendo fornecidas apenas após a garantia de ausência de patógenos. A cultura probiótica é composta de linhagens comerciais, sendo utilizadas por indústrias de alimentos. O produto será avaliado em relação ao aroma, sabor, impressão global, cor e textura, utilizando escala hedônica com notas que vão do 1 (desgostei extremamente) ao 9 (gostei extremamente).

##### **Quanto ao orçamento**

O custo previsto para a análise sensorial é de 300 reais financiado com recursos próprios.

##### **Quanto ao cronograma**

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-8455

**E-mail:** cep266@uel.br



Comitê de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.684.498

Adequado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto assinado pela vice-coordenadora do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

TCLE - redigido em forma de convite, com linguagem acessível, obedecendo a resolução 486/2012 CONEP

**Recomendações:**

não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

não há

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_755798.pdf	29/07/2016 18:53:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaria.doc	29/07/2016 16:51:22	Sandra Garcia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	29/07/2016 16:49:36	Sandra Garcia	Aceito
Folha de Rosto	f.pdf	07/07/2016 17:04:51	Sandra Garcia	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

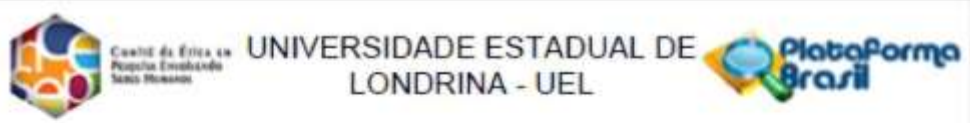
UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.684.498

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 18 de Agosto de 2016

---

Assinado por:

**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
(Coordenador)

## Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### **“Desenvolvimento de Leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* com adição de Extrato de Juçara”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“Desenvolvimento de Leite fermentado por *Lactobacillus reuteri* com adição de Extrato de Juçara”**, a ser realizada no “ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, Londrina/PR ”. O objetivo da pesquisa é “desenvolver um produto fermentado a base de leite, utilizando cultura probiótica (*Lactobacillus reuteri*) ”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: Você participará como provador e irá consumir produtos fermentados de leite formulado, sendo solicitado a dar sua opinião sobre as características do produto (cor, aroma, sabor, etc), informando o quanto você gostou de cada atributo. Será realizada uma sessão e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Esclarecemos ainda, que você não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação. Os benefícios esperados são diminuição no tempo de trânsito intestinal e auxílio na prevenção de doenças crônicas. Quanto aos riscos, sua ingestão não traz riscos à saúde, entretanto, raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais como dores, flatulência ou trânsito intestinal aumentado, que deverão cessar algumas horas após o consumo do produto. Caso ocorra qualquer tipo de desconforto, o julgador será prontamente atendido e amparado pelo pesquisador responsável. Para participar, você deve ser maior de dezoito anos, saudável e não portar Diabetes Mellitus.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (Profª Sandra Garcia, DCTA/UEL, [sgarcia@uel.br](mailto:sgarcia@uel.br), (43) 3371- 5966), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue à você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

**Pesquisador Responsável**

RG:: \_\_\_\_\_

_____ (NOME POR EXTENSO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar <b>voluntariamente</b> da pesquisa descrita acima.
Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____ Data: _____

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.

## Anexo 3: FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL

**TESTE DE ESCALA HEDÔNICA**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra leite fermentado. Por favor, avalie a amostra com relação aos atributos cor, sabor, textura, aroma e aceitação global, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo:

- (9) gostei extremamente
- (8) gostei moderadamente
- (7) goste regularmente
- (6) gostei ligeiramente
- (5) não gostei, nem desgostei.
- (4) desgostei ligeiramente
- (3) desgostei regularmente
- (2) desgostei moderadamente
- (1) desgostei extremamente

Amostra	Cor	Sabor	Aroma	Textura	Aceitação global

Comentários: \_\_\_\_\_

## Anexo 4: Questionário

## COLETA DE DADOS DO PROVADOR

Desejamos avaliar sensorialmente a aceitação de leites fermentados com adição de extrato de Juçara e bactérias lácticas (*Lactobacillus reuteri* LR92). Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, leva em torno de 10 minutos. Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário.

## Dados Pessoais:

Nome

E-mail:

1. Faixa etária:

 15-25 25-35 35-50 acima de 50 anos

3. Ocupação:

 Aluno Funcionário Professor Outro5. Gosta/consome bebida fermentada?  Sim  Não

6. Frequência de consumo de produtos fermentados contendo probióticos:

 Nunca Ocasionalmente - vezes por ano Moderadamente - vezes por mês

Frequentemente - vezes por semana

7. Conhece e/ou já consumiu juçara?  Sim  Não

Anexo 5: Normas LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY