



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição

GABRIEL FERREIRA DE CASTRO

**Efeito do teor de açúcar e congelamento na sobrevivência de *L. paracasei*  
LBC 81 em polpa de açaí**

Brasília - DF

Dezembro - 2020

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Nutrição

GABRIEL FERREIRA DE CASTRO

**Efeito do teor de açúcar e congelamento na sobrevivência de *L. paracasei*  
LBC 81 em polpa de açaí**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Nutrição da  
UnB como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana dos  
Santos

Brasília - DF

Dezembro - 2020

GABRIEL FERREIRA DE CASTRO

**Efeito do teor de açúcar e congelamento na sobrevivência de *L. paracasei*  
LBC 81 em polpa de açaí**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Nutrição da  
UnB como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana dos  
Santos Leandro

Aprovado em: 09/12 /2020

---

M. <sup>a</sup> Maria Carolina Mesquita – Avaliador 1

---

Prof<sup>a</sup>. Viviane Belini – Avaliador 2

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana dos Santos Leandro (Orientadora)

## Dedicatória:

*Em primeiro lugar, dedico esse trabalho a minha irmã e minha mãe, que sempre estiveram ao meu lado para me apoiar e incentivar nos estudos. Agradeço em especial à minha orientadora, Eliana, que me ajudou e aconselhou na produção deste trabalho junto com Pedro Tourinho e Carolina Vogado. Também sou grato a todos os professores, que foram essenciais durante minha vida acadêmica. Por último, dedico este trabalho aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado em meus melhores e piores momentos.*

## RESUMO

**Introdução:** Os consumidores estão cada vez mais preocupados com sua alimentação devido ao aumento no número de doenças crônicas. Com isso, a busca por alimentos funcionais que proporcionam benefícios à saúde vem aumentando cada vez mais. Alimentos adicionados de probióticos, principalmente derivados de leite, são populares no ramo dos alimentos funcionais. No entanto, alergias e intolerâncias a compostos do leite fizeram com que outros alimentos fossem utilizados como carreadores de probióticos como, por exemplo, polpa de frutas. O açaí, além de possuir propriedades que o caracterizam como alimento funcional, é bastante utilizado para incorporação de probióticos. Desse modo, uma polpa de açaí probiótica é uma opção interessante com o viés de que a viabilidade dos probióticos pode ser reduzida devido a processos de congelamento e descongelamento. **Objetivo:** Avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* LBC 81 em polpa de açaí congelada com diferentes concentrações de açúcar. **Metodologia:** estudo de caráter experimental quantitativo e qualitativo, com a elaboração das diferentes formulações polpa de açaí incorporadas de *L. paracasei* LBC 81 e determinação da viabilidade dos probióticos. **Resultados/Discussão:** A sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí elaborada com diferentes teores de açúcar apresentou alta viabilidade, mesmo após sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento. No entanto, alguns erros experimentais impossibilitaram análises mais profundas. **Conclusão:** A polpa de açaí apresentou aspecto protetor contra o congelamento e descongelamento, possibilitando a manutenção da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Os teores de açúcar não influenciaram de forma expressiva a sobrevivência de *L. paracasei* LBC

81. A pandemia de Covid-19 impossibilitou a repetição da parte experimental para corrigir os erros apresentados. Estudos futuros são necessários para definir a sobrevivência a longo prazo.

Palavras chaves: Polpa de açaí; probiótico; *Lactobacillus paracasei* LBC81; congelamento; açúcar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Consumers are increasingly concerned about their food consumption due to the increase in the number of chronic diseases. With this, the search for functional foods that provide health benefits is increasing. Foods added with probiotics, mainly derived from milk, are popular in the field of functional foods. However, allergies and intolerances to milk compounds resulted in other foods being used as carriers for probiotics such as fruit pulp. Açaí, in addition to having properties that characterize it as a functional food, is widely used to incorporate probiotics. Thus, a probiotic açaí pulp is an interesting option with the bias that the viability of probiotics can be reduced due to freezing and thawing processes. **Objective:** To evaluate the survival of *Lactobacillus paracasei* LBC 81 in frozen açaí pulp with different concentrations of sugar. **Methodology:** A quantitative and qualitative experimental study, with the elaboration of different formulations of açaí pulp incorporated in *L. paracasei* LBC 81 and determination of probiotics viability. **Results/Discussion:** The survival of *L. paracasei* LBC 81 in açaí pulp elaborated with different levels of sugar presented high viability, even after successive freezing and thawing cycles. However, some experimental errors made it impossible to perform further analysis. **Conclusion:** The açaí pulp showed a protective aspect against freezing and thawing, enabling the maintenance of the viability of *L. paracasei* LBC 81. Sugar content did not significantly influence the survival of *L. paracasei* LBC 81. The Covid-19 pandemic made it impossible to repeat the experimental part to correct the errors presented. Future studies are needed to define long-term survival.

Key words: Açaí pulp; probiotic; *Lactobacillus paracasei* LBC81; freezing; sugar.

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b>	7
<b>Referencial teórico</b>	9
Bactérias lácticas e probióticos	9
Alimentos probióticos	10
Polpas de frutas congeladas	12
Sobrevivência de probióticos em produtos congelados probióticos	12
<b>Objetivos</b>	13
Objetivo geral	13
Objetivos específicos	13
<b>Material e método</b>	14
Micro-organismo	14
Preparo do concentrado de células de <i>L. paracasei</i> LBC 81	14
Preparo da polpa de açaí com a incorporação de <i>L. paracasei</i> LBC 81	15
Análise microbiológica	15
Determinação da sobrevivência de <i>L. paracasei</i> LBC 81 durante o período de estocagem	15
Determinação da sobrevivência de <i>L. paracasei</i> LBC 81 em condições de estresse de congelamento e descongelamento	15
<b>Resultados e Discussão</b>	16
Sobrevivência de <i>L. paracasei</i> LBC 81 em polpa de açaí com diferentes concentrações de açúcar.	16
Sobrevivência de <i>L. paracasei</i> LBC 81 em polpa de açaí com diferentes teores de açúcar após sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.	17
<b>Conclusão</b>	20
<b>Referências</b>	21

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí elaborada com diferentes teores de açúcar..... 16
- Figura 2** – Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí adicionada de diferentes teores de açúcar após exposição a 5 ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento. .... 18

## 1. Introdução

Os consumidores estão criando cada vez mais consciência e se empoderando acerca de suas escolhas alimentares visando a saúde e o consumo alimentar (DA MATA RIGOTO et al., 2018). Esse aumento do interesse por uma alimentação saudável está ligado ao aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis e sua relação com hábitos alimentares (TARDIDO; FALCÃO, 2006). Em vista disso, a população vem aumentando a demanda por alimentos funcionais que são caracterizados como produtos que oferecem outros benefícios além de seu valor nutricional (OLIVEIRA et al., 2016).

Dentre os alimentos funcionais, os probióticos são cada vez mais demandados pelos consumidores sendo uma das categorias mais lucrativas dentro desse mercado de alimentos (SHORI, 2016). Os probióticos, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2002), consistem em microrganismos vivos que quando utilizados em quantidade adequada são capazes de proporcionar benefícios à saúde do hospedeiro. Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) um alimento probiótico deve conter uma faixa entre  $10^8$  e  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) viáveis após estresses sofridos durante a produção, armazenamento e transição por todo o trato gastrointestinal (DE MELO PEREIRA et al., 2018).

Os efeitos benéficos dos probióticos são vistos nos mais diversos órgãos e sistemas de nosso corpo. Os principais sistemas beneficiados por meio dos probióticos são o sistema imune, respiratório e digestório (SEERENGERAJ, 2018). Contudo, os probióticos devem ser estudados para garantir a segurança em sua utilização e fundamentar os benefícios à saúde alegados para cada microrganismo específico (BRASIL, 2018).

Os microrganismos probióticos são usualmente adicionados a produtos lácteos e derivados como iogurtes, queijos, leites e kefir. No entanto, novas correntes alimentares como vegetarianismo e alergias e intolerâncias causadas por substâncias contidas no leite fizeram com que novas opções de alimentos não derivados do leite começassem a ser utilizados para inserção de probióticos. Em vista disso, alimentos como cereais e suco de vegetais e frutas ganharam grande espaço dentro do mercado de alimentos probióticos (VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).



A utilização de alimentos congelados como carreadores de probióticos também vem crescendo cada vez mais nesse mercado. Esse crescimento se deve ao aumento da vida útil e do tempo de prateleira causados pelo retardo do crescimento de microrganismos deteriorantes que geram perda da vida útil do produto através de mudanças químicas (TERPOU et al., 2019). Exemplos de alimentos congelados probióticos são sorvetes, polpas de fruta, sobremesas e iogurtes congelados (TERPOU et al., 2019; VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Todavia, cultivar probióticos em produtos congelados é um grande desafio. Isso se deve ao fato de que os processos de congelamento e descongelamento causam grande estresse ao microrganismo afetando sua viabilidade e sobrevivência. O congelamento gera formação de cristais de gelo que danificam a parede celular da célula. Por sua vez, o descongelamento ocasiona estresse osmótico e exposição dos probióticos a situação de estresse oxidativo (CALINOIU; VODNAR; PRECUP, 2016; TRIPATHI; GIRI, 2014).

O açaí (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira encontrada na região amazônica do Brasil. A sua polpa é amplamente utilizada na produção de sorvetes, licores, geléias e, principalmente, açaí na tigela. Esse fruto vem ganhando bastante atenção devido a sua utilização como alimento funcional por suas propriedades antioxidantes. Além de suas propriedades funcionais, o açaí possui alto valor nutricional sendo rico em carboidratos, fibras, lipídios e micronutrientes (COSTA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020)

O açaí também é largamente utilizado como matriz para probióticos devido a seus aspectos nutricionais que, além de favorecer o crescimento, protegem os microrganismos garantindo sua viabilidade. Alguns exemplos de produtos de açaí adicionados de probióticos são sorvetes, sobremesas congeladas, iogurtes e bebidas lácteas (COSTA et al., 2017; DA MATA RIGOTO et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2014). Diante do exposto, a produção de uma polpa de açaí congelada probiótica é interessante tanto para a indústria de alimentos como para o mercado consumidor.

## 2. Referencial teórico

### 2.1. Bactérias lácticas e probióticos

As bactérias ácido lácticas (BAL) são classificadas como microaerofílicas, Gram positivas, não esporulantes, catalase negativas e apresentam resistência a ambientes com pH mais ameno. Além disso, podem ser encontradas na forma de cocos ou bastonetes (DE FILIPPIS; PASOLLI; ERCOLINI, 2020; WYSZYŃSKA et al., 2015).

As BALs necessitam de meios específicos, ricos em determinados nutrientes para que possam se desenvolver, atendendo assim seus requisitos nutricionais. De maneira geral, as BAL metabolizam o carboidrato do meio em que se encontram, através da fermentação, gerando como principal produto o ácido láctico (WYSZYŃSKA et al., 2015). Ainda assim, de acordo com os produtos gerados através da fermentação, as bactérias ácido lácticas podem ser classificadas como heterofermentativas e homofermentativas. As bactérias classificadas como heterofermentativas geram ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético e etanol, enquanto as bactérias homofermentativas, por sua vez, produzem majoritariamente o ácido láctico (BRUNO, 2011).

Alimentos fermentados como pão e vinho estão presentes na alimentação dos seres humanos há milhares de anos. Logo, é possível afirmar que as bactérias lácticas já são utilizadas devido às suas propriedades fermentativas há muito tempo (LINARES et al., 2017). A fermentação também proporciona características sensoriais importantes dos alimentos como textura, sabor e aroma (WU; HUANG; ZHOU, 2017). Não somente, as BAL, após a fermentação, geram produtos com características antimicrobianas que agem contra outras bactérias deteriorantes, aumentando assim a vida útil do alimento (ABBASILIASI et al., 2017).

Propriedades probióticas também fizeram com que estas bactérias se tornassem muito utilizadas pela indústria de alimentos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2002), os probióticos são microrganismos vivos que quando utilizados em quantidade adequada são capazes de proporcionar benefícios à saúde do hospedeiro. Os principais espécies probióticos utilizados pela indústria são *Lactobacillus acidophilus*, *L. (para)casei*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus* e as bifidobactérias *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis*, *B. breve* e *B. longum* (LINARES et al., 2017).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) para que um alimento seja considerado probiótico o mesmo deve conter uma faixa entre  $10^8$  e  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) viáveis. Além disso, o uso de probióticos em alimentos necessita de estudos e pesquisas que comprovem e garantam a segurança e os benefícios à saúde alegados para cada microrganismo específico utilizado (BRASIL, 2018).

Seus efeitos benéficos são vistos principalmente no sistema imune, respiratório e digestório. Assim sendo, os probióticos podem trazer benefícios na prevenção e/ou tratamento de doença inflamatória intestinal, diarreia, diabetes, obesidade, câncer do colo intestinal, infecção urinária, entre outros (SEERENGERAJ, 2018).

Entretanto, para que os microrganismos probióticos consigam atuar no hospedeiro e promover os devidos benefícios à saúde, algumas condições são necessárias. Primeiramente, é importante que uma quantidade mínima de UFC chegue ao intestino após serem ingeridas. Já no intestino, é importante que os probióticos, consigam se aderir aos enterócitos e se multiplicar (DE MELO PEREIRA et al., 2018).

Desta forma, para que os probióticos cheguem viáveis ao intestino é necessário que sobrevivam a passagem por todo trato gastrointestinal. Para que isso aconteça, o microrganismo probiótico tem que resistir ao estresse químico do processo de digestão, como ação enzimática, sais biliares e baixo pH do trato gastrointestinal (DE MELO PEREIRA et al., 2018).

## 2.2. Alimentos probióticos

Alimentos fermentados são os principais carreadores de microrganismos probióticos. Isso se deve ao fato de que muitas bactérias responsáveis por realizar essa fermentação também podem apresentar características probióticas. Assim, mesmo que de maneira inconsciente, os seres humanos já realizavam a ingestão de probióticos através desses alimentos fermentados há anos (LINARES et al., 2017)

Os alimentos mais conhecidos e utilizados para manipulação de probióticos são derivados lácteos devido a suas características químicas, físicas e nutricionais que auxiliam na sobrevivência e desenvolvimento desses microrganismos. O pH, teores de gordura e proteínas e presença de outros nutrientes essenciais são exemplos de fatores que auxiliam na sobrevivência dos probióticos (LINARES et al., 2017). Outros alimentos menos convencionais, não derivados do leite, também podem ser usados como carreadores de

probióticos como carnes embutidas, cereais e preparações à base de soja, frutas e vegetais (VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Dentro dos alimentos lácteos probióticos é possível realizar uma divisão em dois grupos específicos. Os produtos lácteos fermentados, compostos por alimentos como iogurtes, queijos, leite fermentado e kefir, que são os mais utilizados pela indústria de alimentos para a inserção de probióticos, e os alimentos lácteos não fermentados, compostos por sorvetes, fórmulas infantis e sobremesas diversas como pudins e mousses (LINARES et al., 2017).

Alimentos congelados vêm sendo cada vez mais utilizados e estudados como carreadores de probióticos pela indústria de alimentos (TERPOU et al., 2019). Isso ocorre devido ao fato de que alimentos com armazenamento congelado, geralmente, possuem um maior tempo de prateleira e conseqüentemente maior vida útil. O congelamento retarda o crescimento de microrganismos deteriorantes e mudanças químicas no alimento (ANVISA, 2018).

O sorvete é um dos principais alimentos congelados utilizado para inserção de probióticos sendo bastante consumido por pessoas de diferentes faixas etárias. Ele é formado por uma mistura de diferentes fases congeladas formadas por cristais de gelo, espuma, bolhas de ar e glóbulos de gordura espalhados por uma fase sérica de proteínas, açúcares e sais. (AKDENIZ; AKALIN, 2019).

Outras características que tornam o sorvete um alimento de interesse para o uso de probióticos são seus componentes como gorduras e proteínas que protegem esses microrganismos das condições de estresse gástrico e pancreáticos. O processamento e armazenamento do sorvete também é benéfico aos probióticos favorecendo a sua sobrevivência quando comparado a outros alimentos como leite fermentado (BALTHAZAR et al., 2018).

Todavia, alergia e intolerância a compostos do leite e regimes alimentares como o veganismo fizeram com que outros alimentos fossem utilizados para a incorporação de probióticos. Sobremesas de vegetais e hortaliça, sucos, entre outros oferecem uma opção interessante para esses públicos específicos (SZYDŁOWSKA; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, 2019).

### 2.3. Polpas de frutas congeladas

A polpa de fruta é classificada como o produto em que não ocorre processo de fermentação, não concentrado, gerado a partir de frutas polposas por meio de processo tecnológico apropriado e que produza o teor mínimo de sólidos em suspensão (BRASIL, 2009). As polpas de frutas são um produto interessante, desde que conservadas suas características sensoriais e nutricionais com controle higiênico-sanitário, pois favorecem a vida útil do fruto freando a senescência natural e permitindo o consumo de determinadas frutas fora da época de sua safra (SANTOS; NETO; DONZELI, 2016).

Dentre as polpas de frutas, destaca-se a polpa de açaí, fruto em que o Brasil é considerado como maior produtor e exportador mundial (CONAB, 2019). Este fruto, conhecido por ser calórico e nutritivo, rico em ácidos graxos monoinsaturados e fibras, vem ganhando atenção devido a suas características fitoquímicas e sua capacidade antioxidante que podem trazer diversos benefícios à saúde. Esses compostos bioativos, que tornam o açaí um alimento funcional, são conhecidos como polifenóis, mais precisamente antocianinas (ALMICO et al., 2018).

O açaí e sua polpa vem sendo cada vez mais utilizados em estudos para produção de alimentos probióticos. A polpa de açaí é incorporada em alimentos como sorvetes, sobremesas congeladas em geral, iogurtes e bebidas lácteas. Na maior parte dos casos, a incorporação do açaí mostrou-se viável para a produção de alimentos probióticos aumentando a sobrevivência de microorganismos e mantendo boa características sensoriais ao produto final (COSTA et al., 2017; DA MATA RIGOTO et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2014).

### 2.4. Sobrevivência de probióticos em produtos congelados probióticos

Além do desafio de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal até a chegada no intestino, os probióticos ainda têm de superar outras adversidades. Um dos maiores desafios para a produção de alimentos probióticos é garantir que os microorganismos sobrevivam aos estresses gerados pelo processamento e armazenamento (ERTEM; ÇAKMAKÇI, 2018).

São vários os fatores que podem afetar a sobrevivência dos microorganismos, podendo eles estar relacionados ao próprio alimento ou a processamentos que estes são submetidos. No processamento do alimento o principal fator de estresse é o tratamento térmico pelo qual o produto é submetido, e consequentes variações de temperatura. Fatores intrínsecos também

podem influenciar a sobrevivência dos probióticos como pH, atividade de água, oxigênio molecular, bacteriocinas e adição de sal, açúcar e corantes (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os alimentos congelados são de grande interesse para implementação de probióticos uma vez que o congelamento aumenta o tempo de vida do produto. No entanto, o processo de congelamento também pode acarretar em grandes danos às membranas celulares das bactérias probióticas. O comprometimento da membrana celular se dá por meio do estresse causado pelos cristais de gelo que se formam no meio intra ou extracelular podendo ser letal para o microrganismo (TRIPATHI; GIRI, 2014).

A velocidade em que o congelamento ocorre afeta de forma direta a viabilidade dos microrganismos em produtos congelados. O congelamento rápido é o mais recomendado para produtos adicionados de probióticos pois produz cristais de gelos menores causando menos danos à integridade celular. O congelamento lento por sua vez gera grandes cristais de gelo que acarretam em danos à membrana celular comprometendo assim a sobrevivência dos probióticos (KIM et al., 2017; TRIPATHI; GIRI, 2014).

O descongelamento também influencia a viabilidade de micro-organismos probióticos, pelo fato de afetar a integridade da membrana celular. Durante o descongelamento as células dos probióticos sofrem efeito do estresse osmótico, afetando a viabilidade da cultura (CALINOIU; VODNAR; PRECUP, 2016). A alta concentração de íons de hidrogênio, oxigênio e ácidos orgânicos presentes no processo de descongelamento também podem afetar a sobrevivência dos probióticos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Desenvolver polpa de açaí adicionada de diferentes teores de açúcar e incorporada com cultura de *L. paracasei* LBC 81;

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do teor de açúcar adicionado na polpa de açaí sobre a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81;
- Analisar a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento em polpa de açaí elaborada com diferentes teores de açúcar.

#### **4. Material e método**

##### **4.1. Micro-organismo**

A cultura de *Lactobacillus paracasei* LBC 81 utilizada neste estudo faz parte da coleção de cultura do Laboratório de Higiene dos Alimentos. O experimento foi realizado a partir da cultura estoque estocado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A cultura congelada foi inoculada em 5 mL de caldo MRS, e posteriormente foi incubada em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas.

##### **4.2. Preparo do concentrado de células de *L. paracasei* LBC 81**

Inóculos de 4 % da cultura ativa foram inoculados em tubos contendo 10 mL de caldo MRS. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. A cultura ativa obtida foi adicionada em tubos contendo 30 mL de caldo MS, e posteriormente os tubos foram incubados na mesma condição mencionada anteriormente. A cultura crescida foi centrifugada (5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos), e em seguida o sobrenadante formado foi descartado. O pellet de células obtido foi lavado com solução salina 0,85 % e imediatamente os tubos foram centrifugados novamente na mesma condição. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células obtido será incorporado na polpa de açaí.

#### 4.3. Preparo da polpa de açaí com a incorporação de *L. paracasei* LBC 81

A polpa de açaí, utilizada para incorporação dos probióticos, foi adquirida em estabelecimento comercial na cidade de Brasília, Distrito Federal. A polpa de açaí foi descongelada, e em seguida distribuída em 2 tubos. Os tubos foram adicionados de 2 % ou 4 % de açúcar. O controle do experimento foi a polpa de açaí sem adição de açúcar. Em seguida, os tubos contendo a polpa de açaí foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. As diferentes formulações de açaí foram adicionadas aos tubos contendo o pellet de células. Os tubos foram homogeneizados em vortex até a dissolução do pellet de células. As suspensões de células em polpa de açaí foram armazenadas a – 18 °C.

#### 4.4. Análise microbiológica

##### 4.4.1. Determinação da sobrevivência de *L. paracasei* durante o período de estocagem

As suspensões de células em polpa de açaí foram avaliadas quanto à sobrevivência de *L. paracasei* antes do congelamento. Os três tratamentos com concentrações diferentes de açúcar foram diluídos serialmente em solução salina 0,85%. As diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram escolhidas para realizar o plaqueamento, por meio da técnica *Drop plate*, em placas de Petri contendo meio MRS ágar. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C por 48 horas.

##### 4.4.2. Determinação da sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em condições de estresse de congelamento e descongelamento

As polpas, após 5 dias de congelamento, foram submetidas a 5 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento. Cada tratamento específico foi descongelado à temperatura ambiente e, imediatamente, submetido ao processo de análise microbiológica conforme descrito no item 2.4.1. O processo de plaqueamento foi realizado três vezes para cada tratamento específico. As placas contendo entre 20 e 80 colônias foram selecionadas para contagem. Por fim, após o fim das análises diárias, os tubos foram novamente submetidos ao congelamento no freezer a -18°C.



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí com diferentes concentrações de açúcar.

A sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 após a incorporação em polpa de açaí elaboradas com diferentes teores de açúcar foi avaliada (Figura 1).

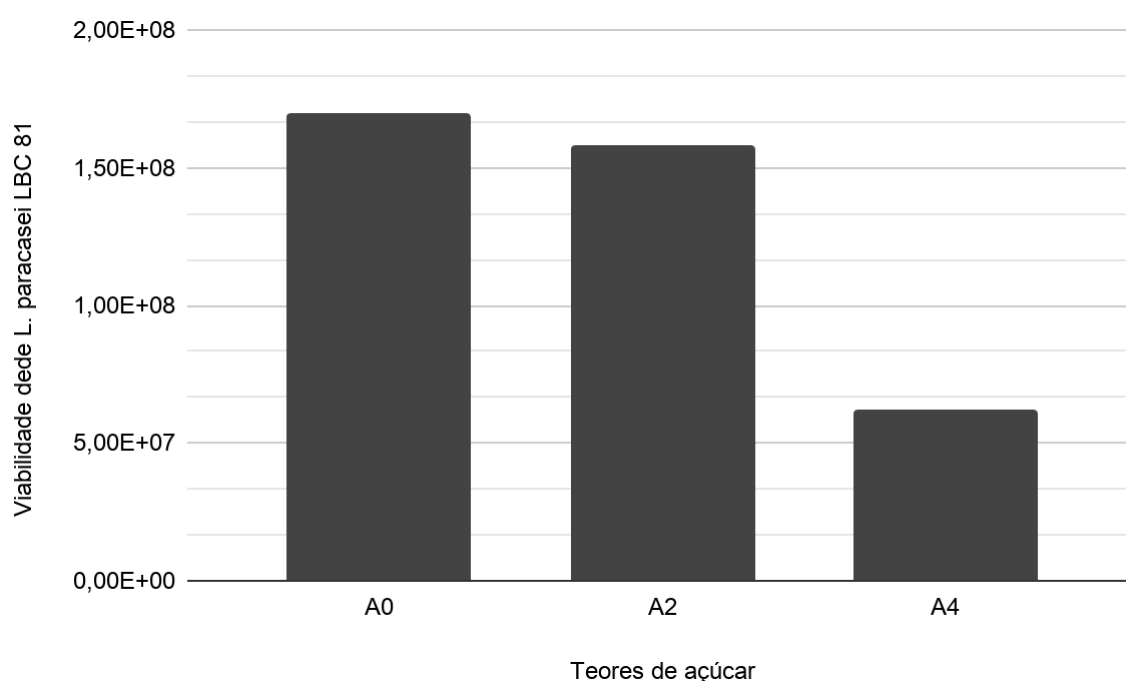


Figura 1 – Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí elaborada com diferentes teores de açúcar.

A viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 aparentemente foi afetada pelo aumento do teor de açúcar adicionado na polpa de açaí. A sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí com 4 % de açúcar foi menor do que nas polpas de açaí com 0 % de açúcar e 2,0 % de açúcar. No entanto, um teor de açúcar de 4 % não seria suficiente para ocasionar um estresse osmótico que comprometesse a viabilidade da cultura. A menor viabilidade da cultura observada na polpa com 4 % de açúcar pode ter sido comprometida por um erro experimental, que pode estar associado a erro no procedimento de diluição ou plaqueamento.

O pH da polpa de açaí encontra-se próximo da faixa de neutralidade e tal característica é considerada adequada para manutenção da viabilidade de micro-organismos probióticos incorporados na polpa de açaí (OLIVEIRA et al., 2020). Sucos de açaí probióticos já são produzidos e comercializados. A marca *Goodbelly* incorpora *L. plantarum* 299v, com mais de 50 bilhões de células viáveis por porção, em suco contendo de açaí e blueberry (PIMENTEL et al., 2019). Logo, a polpa de açaí se mostra como uma ótima opção para ser utilizada como matriz garantindo a viabilidade dos microrganismos. Estudos realizados com quantidades de aproximadamente 7% de açúcar, valor maior do que o utilizado neste trabalho, em matrizes contendo *L. paracasei* LBC 81 evidenciaram que esta quantidade de açúcar não afeta o crescimento e sobrevivência do microrganismo (CAVALCANTI et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Assim sendo, fica evidente a ocorrência de um erro experimental na amostra com adição de 4% de açúcar. Nem o açaí e nem a quantidade de açúcar adicionada justificariam a diferença em relação a contagem de microrganismos com as outras duas amostras.

## 5.2. Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açaí com diferentes teores de açúcar após sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

A sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 após exposição a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento (5 ciclos) em polpa de açaí com diferentes teores de açúcar foi determinada (Figura 2).

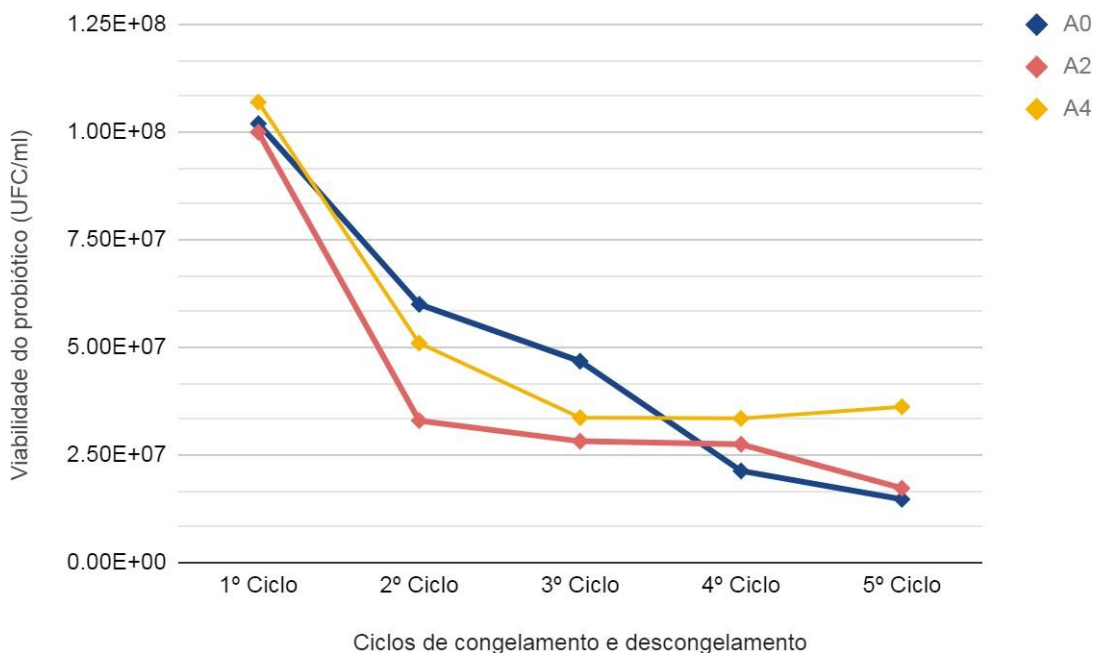


Figura 2 – Sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em polpa de açai adicionada de diferentes teores de açúcar após exposição a 5 ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento.

A sobrevivência de *L. paracasei* ao primeiro ciclo de descongelamento manteve-se alta. As polpas de açai com diferentes teores de açúcar apresentaram aproximadamente a mesma população de *L. paracasei* LBC 81. Assim sendo, nesse primeiro ciclo, o percentual de açúcar não proporcionou efeitos negativos ou positivos na sobrevivência de *L. paracasei*.

É importante ressaltar que o número populacional de microrganismos aumentou na polpa com adição de 4% de açúcar em relação ao tempo inicial analisado anteriormente no item 5.1. Esse aumento populacional confirma, mais uma vez, o erro experimental que ocorreu no tempo inicial e/ou primeiro ciclo.

No segundo ciclo de congelamento e descongelamento, por sua vez, foi possível observar uma redução na viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Na polpa com 2 % de açúcar a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 reduziu em torno de aproximadamente um ciclo logarítmico em relação ao primeiro ciclo.

No entanto, não é possível realizar suposições acerca da sobrevivência de *L. paracasei* nas polpas de açai com adição de 4% de açúcar e sem adição de açúcar. Isso se deve a um erro experimental de diluição que fez com que o número de colônias na placa fosse superior a 80. Dessa forma, o número de contagem de Unidades Formadoras de Colônias é apenas

estimado havendo a possibilidade de não terem ocorrido perda de viabilidade nessas amostras em relação ao primeiro ciclo.

O terceiro ciclo também apresentou redução da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. A amostra de açaí com adição de 2% de açúcar apresentou pequena redução de viabilidade em comparação com o segundo ciclo de congelamento, se mantendo praticamente com a mesma população. A amostra com 4% de açúcar apresentou redução da população de *L. paracasei* de aproximadamente 1 ciclo logarítmico em relação à primeira etapa de congelamento e descongelamento. A polpa de açaí sem adição de açúcar continuou com erro experimental na diluição fazendo com que a população de microrganismos final fosse estimada não sendo possível realizar discussão deste resultado.

O quarto ciclo foi marcado pela manutenção da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 nas polpas de açaí com adição de 2 e 4 % de açúcar, quando comparado com o ciclo anterior. A redução na viabilidade foi quase imperceptível. Na amostra de açaí sem adição de açúcar, no entanto, a perda de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 foi de aproximadamente um ciclo logarítmico quando comparado com o primeiro ciclo de congelamento e descongelamento.

Por último, o quinto ciclo foi marcado pela manutenção da população de *L. paracasei* na polpa de açaí com 4% de açúcar, e redução da população de *L. paracasei* LBC 81 na polpa de açaí sem adição de açúcar e com adição de 2 % de açúcar. Apesar dessas reduções, todas as amostras apresentaram um elevado número populacional de *L. paracasei* ( $10^7$  UFC/g) ao final dos 5 ciclos de descongelamento e congelamento.

A perda de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 durante os sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento se devem, principalmente, ao estresse causado pelo congelamento e descongelamento da polpa de açaí (TRIPATHI; GIRI, 2014). O processo de congelamento pelo qual as polpas de açaí foram submetidas é caracterizado como lento, desse modo, produzindo cristais de gelo grandes que causam maiores danos estruturais a célula afetando a integridade celular, principalmente da parede celular (KIM et al., 2017; TRIPATHI; GIRI, 2014).

O descongelamento sucessivo ao qual as polpas foram submetidas também afetou a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Esse processo expõem as células de *L. paracasei* LBC 81 ao estresse osmótico causando danos celulares (CALINOIU; VODNAR; PRECUP, 2016). Além disso, o descongelamento coloca células de *L. paracasei* LBC 81 em contato com ácidos orgânicos, íons de hidrogênio e íons de oxigênio que são nocivos a esses microrganismos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Contudo, mesmo com os grandes fatores estressantes aos quais os *L. paracasei* LBC 81 foram submetidos, uma população alta manteve-se viável ocorrendo redução de apenas um ciclo logarítmico. Estudo realizado por Cavalcanti et al. (2019) realizou a incorporação de *L. paracasei* LBC 81 em leite fermentado. O leite fermentado produzido foi submetido a processos de congelamento e descongelamento para analisar a sobrevivência do microrganismo que manteve população viável de entre  $10^6$  a  $10^8$  UFC / g do produto. Portanto, *L. paracasei* LBC 81 se mostra um microrganismo viável para resistir a esse tipo de estresse.

O principal fator que possibilitou a viabilidade do *L. paracasei* LBC 81 aos ciclos de congelamento e descongelamento é a matriz em que o microrganismo foi inserido. A polpa de açaí oferece quantidades apropriadas de macronutrientes e de micronutrientes como vitaminas do complexo B, vitamina C e minerais como cálcio e magnésio que favorecem a sobrevivência dos probióticos (OLIVEIRA et al., 2020; SHAH et al., 2010).

Os compostos flavonóides presentes no açaí, em especial as antocianinas, juntamente com a vitamina C conferem caráter antioxidante ao fruto. Essas substâncias protegem os microrganismos de estresses oxidativos presentes, principalmente, no descongelamento (SHAH et al., 2010).

A quantidade de açúcar incorporada à polpa de açaí, apesar de sua propriedade crioprotetora, não influenciou de forma relevante a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Entretanto, a polpa com adição de 4% de açúcar apresentou resultados ligeiramente melhores ao final dos cinco ciclos de congelamento e descongelamento do que as polpas sem adição de açúcar e com adição de 2 % de açúcar. Provavelmente, um maior tempo de estocagem e maiores concentrações de açúcar fossem necessários para que resultados mais expressivos fossem atribuídos (AKIN; AKIN; KIRMACI, 2007).

## **6. Conclusão**

Ao final deste estudo, foi possível chegar a conclusão de que a polpa de açaí apresentou efeito protetor para a *L. paracasei* LBC 81. Mesmo após 5 ciclos de congelamento e descongelamento, a polpa de açaí apresentou alta viabilidade com população de  $10^7$  UFC / g do produto.

Além disso, os diferentes teores de açúcar adicionados na polpa de açaí não apresentaram grande influência na viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. Todas as formulações

de polpa de açaí apresentaram números viáveis de *L. paracasei* LBC 81 não havendo uma diferença expressiva nas diferentes amostras.

Os erros experimentais presentes no tempo inicial do experimento (tempo “0”) e em alguns dos ciclos de congelamento e descongelamento impossibilitaram o debate de alguns dos resultados obtidos. A análise de viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 não pode ser realizada por um período mais prolongado, devido a pandemia de Covid-19.

## 7. Referências

ABBASILIASI, S. et al. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. **RSC Advances**, v. 7, n. 47, p. 29395–29420, 2017.

AKDENIZ, V.; AKALIN, A. S. New approach for yoghurt and ice cream production: High-intensity ultrasound. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, n. February, p. 392–398, 2019.

AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 93–99, 2007.

ALMICO, J. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e química de polpas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) pasteurizadas congeladas comercializadas em Aracaju-SE. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 2, p. 156–168, 2018.

ANVISA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas**. Brasil, 2008.

ANVISA. Guia para determinação de prazos de validade de alimentos. **Diário da União**, p. 1–76, 2018.

BALTHAZAR, C. F. et al. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. **Food Chemistry**, v. 246, p. 464–472, 2018.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. REGULAMENTA A LEI Nº 8.918, DE 14 DE JULHO DE 1994, QUE DISPÕE SOBRE A PADRONIZAÇÃO, A CLASSIFICAÇÃO, O REGISTRO, A INSPEÇÃO, A PRODUÇÃO E A FISCALIZAÇÃO DE BEBIDAS. **Diário Oficial da União, Brasília, 4 jun. 2009**. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm). Acesso em: 9 set. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas. **Diário Oficial da União, Nº 6, Brasília, 10 de janeiro de**

2000.

BRASIL. Resolução RDC nº. 241, de 26 de julho de 2018. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2018.**

BRUNO, L. M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos**, p. 15, 2011.

CALINOIU, L.-F.; VODNAR, D.-C.; PRECUP, G. A Review: The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. **Bulletin UASVM Food Science and Technology**, v. 73, n. 2, p. 55–60, 2016.

CAVALCANTI, M. H. et al. Production of frozen probiotic fermented milk enriched with green banana biomass: The effects of freezing, acid stress conditions and bile salts on *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 viability. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 2, p. 1–9, 2019.

CONAB. **Boletim da Sociobiodiversidade**. [s.l: s.n.].

COSTA, M. G. M. et al. Synbiotic Amazonian palm berry (açai, *Euterpe oleracea* Mart.) ice cream improved *Lactobacillus rhamnosus* GG survival to simulated gastrointestinal stress. **Food and Function**, v. 8, n. 2, p. 731–740, 2017.

DA MATA RIGOTO, J. et al. Effect of açai pulp, cheese whey, and hydrolysate collagen on the characteristics of dairy beverages containing probiotic bacteria. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 1, p. 1–10, 2019.

DE FILIPPIS, F.; PASOLLI, E.; ERCOLINI, D. The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. **FEMS Microbiology Reviews**, n. January, p. 1–36, 2020.

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2060–2076, 2018

ERTEM, H.; ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and *Gobdin*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 776–783, 2018.

FAO, J. et al. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. p. 1–11, 2002.

KIM, H. W. et al. Probiotic supplementation and fast freezing to improve quality attributes and oxidation stability of frozen chicken breast muscle. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 34–41, 2017.

LINARES, D. M. et al. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017.

OLIVEIRA, A. R. et al. Structural and physicochemical properties of freeze-dried açai pulp

- (Euterpe oleracea mart.). **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 282–289, 2020.
- OLIVEIRA, D. et al. Consumers' attention to functional food labels: Insights from eye-tracking and change detection in a case study with probiotic milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 160–167, 2016.
- PIMENTEL, T. C. et al. Fruit juices as probiotic foods. **Sports and Energy Drinks**. Woodhead Publishing, 2019.p. 483-513.
- SANTOS, E. H. F.; NETO, A. F.; DONZELI, V. P. Aspectos físico-químicos e microbiológicos de polpas de frutas comercializadas em Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.
- SANTOS, M. C. M. DOS et al. Fermentation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and coconut (*Coccus nucifera* L.) beverages by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81: The influence of sugar content on growth and stability during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 132, 2020.
- SEERENGERAJ, V. Probiotics: The Marvelous Factor and Health Benefits. **Biomedical and Biotechnology Research Journal**, v. 2, p. 1–8, 2018.
- SHAH, N. P. et al. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, p. 278–282, 2010.
- SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.
- SZYDŁOWSKA, A.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Development of potentially probiotic and synbiotic pumpkin frozen desserts. **CYTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 251–259, 2019.
- TARDIDO, A. P.; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 2, p. 111–116, 2006.
- TERPOU, A. et al. Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, n. February, p. 242–249, 2019.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.
- VASCONCELOS, B. G. et al. Innovative açai (*Euterpe oleracea*, Mart., *Arecaceae*) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 1843–1849, 2014.
- VIJAYA KUMAR, B.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112–6124, 2015.
- WU, C.; HUANG, J.; ZHOU, R. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and



potential applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 393–404, 2017.

WYSZYŃSKA, A. et al. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 2967–2977, 2015.