



Bebida de maracujá e isolado protéico de soro adicionada de *Lactobacillus rhamnosus* GG

Adriana Couto Guerra; Eliane Maurício Furtado Martins; Roselir Ribeiro da Silva; Frederico Souzalima Caldoncelli Franco; Thainá de Melo Carlos Dias; Maurilio Lopes Martins

Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG, Brasil

RESUMO

O consumo de alimentos funcionais é tendência mundial, destacando-se aqueles adicionados de probióticos ou de isolado proteico de soro (WPI). Objetivou-se desenvolver e caracterizar bebida contendo maracujá e WPI, adicionada de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). A bebida continha 9,45% de WPI, 35% de polpa de maracujá e 10% de açúcar e a cada 200 g da mesma, foram adicionadas 10^{10} células de LGG. Acidez titulável, pH, Sólidos Solúveis Totais (SST), proteína e cor foram determinados nos tempos 0, 14 e 28 dias a 5,0 °C. A contagem de fungos filamentosos e leveduras, Número Mais Provável de coliformes e presença/ausência de *Salmonella* spp. foram determinados nos tempos 0 e 28 dias, sendo a viabilidade de LGG nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Os valores de acidez titulável, pH, SST, proteína e cor não diferiram ($p > 0,05$) ao longo de 28 dias, indicando que LGG não fermentou a bebida. O produto apresentou-se seguro e as contagens de LGG mantiveram-se acima de 7,70 log UFC/mL ao longo do armazenamento estando em consonância com os padrões internacionais para alimentos probióticos, uma vez que esses produtos devem possuir $> 10^6$ UFC do microrganismo por porção. Portanto, o desenvolvimento da bebida potencialmente funcional é viável.

Palavras-chave: Fruta tropical; Bebida; Soro de leite; Probiótico.



1 INTRODUÇÃO

Os suplementos nutricionais voltados para a prática esportiva buscam atender a consumidores e adeptos dessa prática e que possuem esse estilo de vida, os quais são cada vez mais conscientes da saúde e informados sobre as escolhas nutricionais, o que contribuiu para que os mesmos alcançassem um ponto forte e crescente no mercado.

Os suplementos são utilizados para atender e melhorar alguns aspectos do desempenho físico, sendo o isolado proteico de soro (*Whey Protein Isolate* - WPI) um dos principais suplementos proteicos utilizados. É extraído do soro de leite bovino, rico em proteínas de alto valor biológico, além de conter vitaminas e minerais (Timoteo & Ferreira, 2017). A suplementação de proteínas é frequentemente observada em conjunto com diferentes tipos de exercício para melhorar o desempenho do mesmo (Patterson; Waldron & Jeffries, 2019), para aumentar a massa muscular associada ao exercício e/ou melhorar a recuperação após os exercícios (Ali; Lee & Rutherford-Markwick, 2019).

Entre os alimentos funcionais destacam-se os probióticos. Estes alimentos alteraram, modificam e restabelecem a microbiota intestinal pré-existente (Pandey; Naik & Vakil, 2015). Assim, destaca-se a importância da utilização dos alimentos contendo probióticos a fim de melhorar a resposta imune dos atletas (Palomar et al., 2017), aumentar as bactérias consideradas benéficas no intestino (Marchesi et al., 2016), a resistência à patógenos e atuar no metabolismo (Petersen et al., 2017).

Sucos de frutas também podem ser considerados produtos adequados para a adição de culturas probióticas (Lebaka et al., 2018), pois são bebidas saudáveis e refrescantes, possuem compostos bioativos (minerais, vitaminas, fibras e antioxidantes), bem como são consumidos regularmente por pessoas de todas as idades. O maracujá é uma fruta tropical, muito popular



e conhecida por seu aroma floral. Possui elevado interesse comercial e aceitação no mercado consumidor, sendo seu suco muito consumido em razão de seu valor nutricional (Rocha, 2016), o que justifica seu emprego na produção de bebidas para diferentes grupos populacionais como crianças, idosos, praticantes de atividades físicas, entre outros.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os maracujás foram adquiridos no comércio de Rio Pomba, MG, em estágio de maturação comercial e foram selecionados, lavados em água corrente, sanitizados em água contendo 100 mg/L de cloro ativo, por 20 minutos, e enxaguados em água potável. A polpa passou por trituração em liquidificador e as sementes foram retiradas com auxílio de peneira. O produto final obtido foi armazenado a -18 °C até o momento do uso.

Para a produção das bebidas foi utilizado 9,45% de WPI sem sabor com 81,8% de proteína, 35% de polpa de maracujá e 10% de açúcar. Após a pesagem do WPI, polpa e açúcar, a água foi adicionada para completar a massa final de 200 gramas. O WPI, polpa, açúcar e água foram homogeneizados manualmente. As bebidas preparadas foram transferidas para frascos de 200 g e pasteurizadas a 65 °C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente, a mesma foi resfriada e armazenada a 5,0 °C para adição da cultura probiótica de *L. rhamnosus* GG (Culturelle®). Inicialmente, o conteúdo de uma cápsula da cultura liofilizada contendo $1,5 \times 10^{10}$ células foi adicionado em 200 g das bebidas pasteurizadas, sendo as células homogeneizadas e os produtos armazenados a 5,0 °C. Também foram preparadas bebidas controle que não foram adicionadas de *L. rhamnosus* GG.

A qualidade físico-química das bebidas foi avaliada no tempo 0 (imediatamente após a obtenção) e nos tempos 14 e 28 dias de armazenamento a 5,0 °C em três repetições. As análises físico-químicas de acidez láctica e cítrica, pH, sólidos solúveis e proteína foram



realizadas de acordo com AOAC (2016). Também foram determinadas a cor instrumental (Moreira et al., 2017) das amostras. A microbiota contaminante da bebida foi avaliada nos tempos 0 e 28 dias em três repetições pela contagem padrão de fungos filamentosos e leveduras (Beuchat & Cousin, 2001), de coliformes a 36 °C e a 45 °C (Kornacki & Johnson, 2001) e pela avaliação de *Salmonella* sp. (Andrews et al., 2001). A viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas amostras foi determinada no tempo zero (T0), e nos dias 7, 14, 21 e 28 de armazenamento dos produtos a 5,0 °C de acordo com Richer & Vedamuthu (2001) em meio de cultura de Man, Rogosa Sharpe (MRS, Neogen, USA) adicionado de púrpura de bromocresol, carbonato cálcio e tween 80.

Nos experimentos de caracterização físico-química e de viabilidade de *L. rhamnosus* GG foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. O teste de Tukey foi aplicado para comparações entre as médias ao longo do tempo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes (Ferreira; Cavalcanti & Nogueira, 2011) no ambiente "R" (R Core Team, 2014) e Statistica 13.0 (Tibco, 2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) nos valores de acidez titulável e pH (Tabela 1) nas bebidas que continham 35% de polpa de maracujá e WPI ao longo de 28 dias de armazenamento a 5,0 °C, o que indica que *L. rhamnosus* GG não fermentou o produto, o que era esperado devido essa bactéria não ser psicrotrofica. Por outro lado, Furtado et al. (2019) constataram que ao longo de 28 dias de armazenamento do suco tropical de manga adicionado de *L. rhamnosus* GG, o pH reduziu significativamente ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Valores médios dos resultados das análises físico-químicas das bebidas

Parâmetros	Tempo (dia)		
	0	14	28
Acidez láctica (%)	2,16	2,19	2,23
Acidez cítrica (%)	1,49	1,58	1,58
pH	3,99	3,77	3,85
SST (°Brix)	22,9	22,8	22,3
Proteína (%)	7,79	7,84	7,96
L*	40,73	36,84	41,36
a*	4,45	3,56	4,73
b*	28,51	34,59	29,88

Estudos demonstram que o pH é um dos fatores mais importantes que afetam a sobrevivência dos probióticos. Os sucos contêm um alto teor de ácidos orgânicos e baixo pH, assim, há uma ação combinada de condições ácidas e o efeito antimicrobiano intrínseco dos ácidos sobre os microrganismos nos alimentos, bem como do oxigênio e outros compostos bactericidas (Gomand et al., 2019). Os lactobacilos são geralmente resistentes e resistem em sucos com pH variando de 3,7 a 4,3 (Tripathi & Giri, 2014), valores próximos aos encontrados na bebida elaborada nesse estudo, o que sugere o potencial da mesma como matriz carreadora de *L. rhamnosus* GG.



Farias; Soares & Gouveia (2016) constataram que *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresentou crescimento e produção de ácido lático em polpa de maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.). Entretanto, nesse trabalho *L. rhamnosus* GG não fermentou a 5,0 °C a bebida que continha 35% de polpa de maracujá e WPI.

Constatou-se que os valores de sólidos solúveis totais e proteína da bebida também não alteraram ($p > 0,05$) ao longo de 28 dias de armazenamento a 5,0 °C (Tabela 1), o que indica que *L. rhamnosus* GG não utilizou os carboidratos e proteínas disponíveis na mesma. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com a utilização de bactérias probióticas adicionadas em bebidas à base de vegetais também demonstraram não haver alteração dos valores de sólidos solúveis totais ao longo do período de armazenamento (Moreira et al., 2017; Campos et al., 2019; Furtado et al., 2019).

Os teores de sólidos solúveis totais apresentaram variações entre 9,0 a 11,66 °Brix no suco tropical de maracujá em diferentes marcas comerciais avaliadas por Ferreira et al. (2015). Entretanto, a bebida desenvolvida neste estudo apresentou teor de sólidos solúveis mais elevado (Tabela 1) devido à adição de 9,45% de isolado proteico de soro e 10% de sacarose.

O percentual de proteína adicionado em 200 g da bebida desenvolvida nesse estudo foi de 7,73%, sendo o mesmo disponível na quantidade de 18,9 g de WPI, o qual continha 15,46 g de proteína, adicionado no produto. A média geral dos percentuais de proteína na bebida foi de 7,86% (Tabela 1) estando ligeiramente acima da quantidade adicionada, o que pode ser devido ao teor de proteína presente na bebida sem WPI.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para luminosidade L^* e para as coordenadas a^* e b^* na bebida elaborada ao longo do tempo de armazenamento a 5,0 °C (Tabela 1), evidenciando que a adição de *L. rhamnosus* GG não promoveu alteração de cor da bebida. A utilização de bactérias probióticas em bebidas à base de

vegetais também demonstrou que não houve alteração de cor das mesmas ao longo do período de armazenamento (Oliveira et al., 2017; Campos et al., 2019; Furtado et al., 2019). Analisando-se os valores de b^* constata-se que a bebida tendeu à cor amarela devido à adição de polpa de maracujá (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Furtado et al. (2019) em suco tropical de manga adicionado de *L. rhamnosus* GG durante 28 dias de armazenamento a 8 °C.

A bebida desenvolvida apresentou qualidade microbiológica satisfatória por possuir baixa contagem de fungos filamentosos e leveduras, < 3,0 NMP/mL de coliformes e ausência de salmonela em 25 mL (Tabela 2). Além disso, o produto atendeu ao estabelecido na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC n.º12) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001).

Tabela 2 – Qualidade microbiológica da bebida

Microbiota avaliada	0 dia	28 dias
Fungos filamentosos e leveduras (UFC/mL)	$2,7 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$
Coliformes a 30 °C (NMP/mL)	< 3,0	< 3,0
Coliformes a 45 °C (NMP/mL)	< 3,0	< 3,0
<i>Salmonella</i> sp. em 25 mL	Ausência	Ausência

As contagens médias de *L. rhamnosus* GG nas bebidas mantiveram-se acima de 7,70 log UFC/mL ao longo do período de armazenamento estudado. Os resultados obtidos estão em consonância com os padrões internacionais para produtos probióticos, uma vez que esses



alimentos devem possuir uma contagem mínima do microrganismo probiótico no produto pronto $>10^6$ UFC por porção (Hussain et al., 2016). Dessa forma, com base na literatura consultada, a bebida desenvolvida pode ser considerada veículo promissor da bactéria probiótica, uma vez que contêm acima de 7,0 log UFC de *L. rhamnosus* GG por mililitro do produto. Além disso, ela atende a legislação brasileira quanto à contagem mínima de probióticos (Brasil, 2008). Na bebida do tratamento controle em que não se adicionou *L. rhamnosus* GG, a contagem de bactérias lácticas foi $< 1,0 \times 10^0$ UFC/mL estando de acordo com o esperado, uma vez que a bactéria probiótica não foi adicionada na mesma.

4 CONCLUSÃO

A adição de *L. rhamnosus* GG à bebida não ocasionou alterações físico-químicas no produto armazenado a 5,0 °C por 28 dias. O produto também apresentou qualidade microbiológica satisfatória, potencial probiótico e pode ser considerado suplemento nutricional para praticantes de atividades físicas.

5 Agradecimentos

Ao grupo PET Ciências Agrárias pelo apoio financeiro e à empresa Proregi Aditivos para Alimentos pela doação do WPI.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, A., Lee, S. J. & Rutherford-Markwick, K. J. (2019). Sports and exercise supplements whey proteins. In C. Hilton, H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins: From Milk to Medicine* (pp. 579-635). Academic Press.

Andrews, W. H., Flower, R. S., Silliker, J. & Bailey, J. S. (2001). Salmonella. In: F. P. Downes & K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 357-380). Washington: American Public Health Association – APHA.

AOAC - Association Of Official Analytical Chemists (2016). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington: Association Of Official Analytical Chemists.

Beuchat, I. R. & Cousin, M. A. (2001). Yeasts and molds. In F. P. Downes & K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 209-215). Washington, DC: American Public Health Association-APHA.

Brasil. (2001). Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b



Brasil. (2008). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovada – Atualizada em julho/2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/comissoes/tecno_lista_alega.htm.

Campos, R. C. A. B., Martins, E. M. F., Pires, B. A., Peluzio, M. C. G., Ramos, A. M., Leite Júnior, B. R. C., Martins, A. D. O., Silva, R. R. & Martins, M. L. (2019). *In vitro* and *in vivo* resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merril) and jussara (*Euterpe edulis Martius*) juice to the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 116: 1247-1257.

Farias, N., Soares, M. & Gouveia, E. (2016). Improvement of viability *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a rotating central composite design. *LWT – Food Science and Technology*, 71: 149-154.

Ferreira, A., Sales, L., Cavalcante, M., Cunha, N. R. & Ribeiro, S. (2015). Avaliação de Parâmetros de Qualidade Físico-Químicos de Sucos Tropicais. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2): 3105-3111.

Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P. & Nogueira, D. A. (2011). Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. *Revista de Estatística da UFOP*, 1(1): 1-9.



Furtado, L. L., Martins, M. L., Ramos, A. M., Silva, R. R., Leite Júnior, B. R. C. & Martins, E. M. F. (2019). Viability of probiotic bacteria in tropical mango juice and the resistance of the strains to gastrointestinal conditions simulated *in vitro*. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(1): 149-162.

Gomand, F., Borges, F., Burgain, J., Guerin, A. M., Junelles, R. & Gaiani, C. (2019). Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. *Annual review of food science and technology*, 10: 285-310.

Hussain, S. A., Patil, G. R., Yadav, V., Singh, R. R. B. & Singh, A. K. (2016). Ingredient formulation effects on physico-chemical, sensory, textural properties and probiotic count of *Aloe vera* probiotic dahi. *LWT – Food Science and Technology*, 65: 371-380.

Kornacki, J. L. & Johnson, J. L. (2001) *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In F. P Downes & K. Ito (Eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 69-82). Washington: American Public Health Association.

Lebaka, V. R., Wee, Y. J., Narala, V. R. & Josh, V. K. (2018). Development of new probiotic foods-A case study on probiotic juices. In A. M. Grumezescu & A. M. Holbam (Eds.). *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (pp. 55-78). Academic Press.



Marchesi, R. J., Adams, H. D., Fava, F., Hermes, A. D. G., Hirschfield, M. G., Hold, G., Quraishi, N. M., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, M. K., Thomas, T. V. L., Zoetendal, G. E. & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2): 330-339.

Moreira, R. M, Martins, M. L., Leite Júnior, B. R. C., Martins, E. M. F, Ramos, A. M., Cristiani, M., Campos, A. N. R., Stringheta, P. C., Silva, V. R. O., Canuto, J. W., Oliveira, D. C. & Pereira, D. C. S. (2017). Development of a juçara and Uba mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. *LWT- Food Science and Technology*, 77: 259-268.

Oliveira, P. M., Ramos, A. M., Martins, E. M. F.; Vieira, E. N. R., Soares, A. S. & Noronha, M. C. (2017). Comparison of vacuum impregnation and soaking techniques for addition of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to minimally processed melon. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(12): 2547-2554.

Palomar, M. M., Bru, E., Maldonado, C. G. & Perdigón, G. (2017). Oral probiotics supplementation can stimulate the immune system in a stress process. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 8: 29-40.

Pandey, K. R., Naik, S. R. & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal Food Science Technology*, 52(12): 7577-7587.



Patterson, D., Waldron, M. & Jeffries, O. (2019). Proteins and Amino Acids and Physical Exercise. In S. Walrand (Ed.). *Nutrition and Skeletal Muscle* (pp. 183-196). Academic Press.

Petersen, M. L., Bautista, J. E., Nguyen, H., Hanson, M. B., Chen, L., Lek, H. S., Sodergren, E. & Weinstock, M. G. (2017). Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists. *Microbiome*, 5(1): 98.

Rocha, I. F. O. (2016). Suco de maracujá: perfil sensorial, estudo do consumidor e avaliação da função gustativa em indivíduos com diabetes *Mellitus* tipo 1 e tipo 2. 117 f. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

Richer, R. L. & Vedamuthu, E. R. (2001). Milk and milk products. In F. P. Downes & K. Ito (Eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 483-496). Washington, DC: American Public Health Association

TIBCO. (2017) Software Inc. Statistica (data analysis software system), version 13. Disponível em: <http://statistica.io>. 2017.

Timoteo, G. R. & Ferreira, M. C. M. (2017). Análise do teor de macronutrientes em suplementos dietéticos tipo *whey protein*. *Revista Iniciar*, 2(1).



Tripathi, M. K. & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9: 225-241.