UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

THATYANE VIDAL FONTELES

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA BEBIDA FUNCIONAL PROBIÓTICA À BASE DE SUCO DE MELÃO *CANTALOUPE* SONIFICADO

Fortaleza
2011

THATYANE VIDAL FONTELES

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA BEBIDA FUNCIONAL PROBIÓTICA À BASE DE SUCO DE MELÃO *CANTALOUPE* SONIFICADO

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

Área de Concentração:
Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Enzimática e Microbiana

Orientadora:
Profa. Dra. Sueli Rodrigues

Fortaleza
2011

F762d Fonteles, Thatyane Vidal
Desenvolvimento de uma nova bebida funcional probiótica à base de suco de melão cantaloupe sonificado / Thatyane Vidal Fonteles..
133f: il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues
Área de concentração: **Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Microbiana e Enzimática**
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2011.

1. Bebidas fermentadas 2. Lactobacillus 3. Probióticos – suco 4. Melão I. Rodrigues, Sueli (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos III. Título

CDD 664

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos Área de concentração Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Enzimática e Microbiana.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Thatyane Vidal Fonteles

Thatyane Vidal Fonteles

Dissertação aprovada em 10 de Fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Universidade de São Paulo

Pesquisador Dr. Edy Sousa de Brito
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Para minha mãe, a mulher mais bondosa, digna e incansável que conheço

Para meu amado avô, Vidal (in memorian)

Dedico

AGRADECIMENTOS

Pela contribuição para a realização do presente trabalho, gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos:

À professora Sueli Rodrigues, pela acolhida, orientação impecável, pelo estímulo em prosseguir quando começaram a surgir os primeiros obstáculos, pela confiança em meu trabalho e principalmente, pela generosidade em dividir comigo uma pequena parte do seu conhecimento.

Ao professor Dr. Fabiano André Narciso Fernandes do Departamento de Engenharia Química (DEQ-UFC) pelas valiosas contribuições sobre a tecnologia ultra-sônica.

À professora Dra. Raquel Miranda e à doutoranda Luciana de Siqueira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM-UFC) pelos ensinamentos sobre atividade enzimática.

À professora Dra. Susana Saad e ao pesquisador Dr. Edy Brito por gentilmente aceitarem o convite para participar da banca examinadora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e custeio desta pesquisa.

Ao apoio do Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT).

À ARS *Culture Collection* pela linhagem concedida.

A todos da família LABIOTEC, em especial à Ana Lúcia, Ana Laura, Claudinha, Cris Rabelo, Imy, Mari, Mayra, Niédila, Rayane, Rosane, Simone, Soraya e Tati Maciel pelo clima constante de amizade e pelos momentos de descontração que sem dúvida, foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às “Anas” Laura e Lúcia pela amizade e apoio imprescindível durante os experimentos.

À Cláudia Fontes pela realização das análises cromatográficas.

À Mayra por dividir comigo o conhecimento, as dúvidas e sua amizade durante todo o mestrado.

Aos meus amigos da graduação, em especial, à Gisani, Genilton, Rubens e Écio.

Agradeço à Niédila que sempre me contagiou com seu alto astral e empolgação. Sua amizade foi e sempre será muito importante para mim.

À Simone, mais do que uma companheira durante toda minha investida na área acadêmica, minha amiga querida, obrigada pela ajuda, amizade verdadeira e por suas orações.

Agradeço especialmente aos meus pais, Eliane e Iso. A eles dedico minha eterna gratidão por todo o investimento e apoio à minha formação e pelo amor incondicional dedicado a mim. **Nunca agradecerei o bastante**.

Às minhas irmãs, Lidianny e Islane, por serem minhas melhores amigas e incentivadoras. Mesmo de longe, sempre acreditaram que tudo em que sempre investi seria possível.

Ao Henrique, meu grande amor e amigo, eu agradeço por todo o seu cuidado, carinho, cumplicidade e amor. Obrigada por fazer a minha vida mais feliz.

À Deus, meu refúgio, minha fortaleza, em quem deposito toda minha confiança, agradeço pela benção da vida.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 01

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica

1. Alimentos funcionais probióticos 04
2. Bactérias ácido-láticas 05
   - 2.1 Gênero *Lactobacillus* 07
     - 2.1.1 Metabolismo 09
     - 2.1.2 *Lactobacillus casei* NRRL B-442 11
3. Alegações funcionais atribuídas aos alimentos probióticos 13
4. Aspectos tecnológicos 16
   - 4.1 Efeitos de culturas probióticas sobre características tecnológicas 17
     - 4.1.1 Acidez 17
     - 4.1.2 Flavour 18
     - 4.1.3 Viscosidade 19
5. Emprego de bactérias probióticas em alimentos 20
6. Sucos de frutas como veículos de culturas probióticas 21
7. Suco de melão 23
8. Tecnologia ultra-sônica aplicada ao processamento de alimentos 26

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 29

CAPÍTULO 2: Otimização do processo fermentativo de suco de melão por *Lactobacillus casei* NRRL B-442

RESUMO 43

ABSTRACT 43

1. INTRODUÇÃO 44
2. MATERIAL E MÉTODOS 45
   - 2.1 Obtenção do micro-organismo 45
   - 2.2 Ativação de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 45
   - 2.3 Preparo do suco de melão 45
   - 2.4 Caracterização do suco de melão 45
     - 2.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH) 46
     - 2.4.2 Determinação de açúcares 46
     - 2.4.3 Determinação de proteínas 47
   - 2.5 Otimização do processo de produção do suco 47
     - 2.5.1 Determinação do crescimento microbiano 49
     - 2.5.2 Contagem de células viáveis de *Lactobacillus casei* no suco fermentado 49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

3.1 Composição do suco de melão 50
3.2 Otimização do processo de elaboração do suco de melão probiótico 51
4. CONCLUSÕES 57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57
CAPÍTULO 3: Influência do processamento ultra-sônico na qualidade de suco de melão
RESUMO 61
ABSTRACT 61
1. INTRODUÇÃO 62
2. MATERIAL E MÉTODOS 63
2.1 Preparo do suco de melão 63
2.2 Tratamento ultra-sônico 63
2.3 Cálculo da intensidade da energia ultra-sônica 63
2.4 Métodos analíticos 64
2.4.1 Determinação de cor instrumental 64
2.4.2 Atividade enzimáticas 65
2.4.2.1 *Peroxidase (POD)* 65
2.4.2.2 *Polifenoloxidase (PPO)* 65
2.4.2.3 *Peroxidase do ascorbato (APx)* 66
2.4.3 Atividade residual (AR) 66
2.4.4 Determinação de compostos fenólicos 67
2.4.5 Homogeneização 67
2.5 Planejamento experimental 67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 69
3.1 Cor 69
3.2 Influência do ultra-som na atividade enzimática 72
3.2.1 Peroxidase (POD) 72
3.2.2 Polifenoloxidase (PPO) 77
3.2.3 Peroxidase do ascorbato (APx) 81
3.3 Redução de compostos fenólicos 84
3.4 Efeito do ultra-som na homogeneização do suco de melão 85
4. CONCLUSÕES 87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

CAPÍTULO 4: Cinética do processo fermentativo de suco de melão por *Lactobacillus casei* NRRL B-442 e influência da estocagem refrigerada nos parâmetros de qualidade da bebida

RESUMO 95

ABSTRACT 95

1. INTRODUÇÃO 96

2. MATERIAL E MÉTODOS 97

2.1 Estudo cinético do processo fermentativo 97

2.2 Estabilidade físico-química e microbiológica da bebida fermentada 97

2.3 Métodos analíticos 99

2.3.1 Determinação de cor instrumental 99

2.3.2 Determinação do crescimento microbiano 99

2.3.3 Contagem de células viáveis de *Lactobacillus casei* no suco fermentado 100

2.3.4 Determinação do pH 100

2.3.5 Quantificação de açúcares e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 100

2.4 Cálculo do valor calórico do suco de melão probiótico 102

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 103

3.1 Estudo cinético do processo fermentativo 103

3.2 Influência da estocagem refrigerada na estabilidade da bebida fermentada 106

3.2.1 Sobrevivência de *L. casei* B-442 106

3.2.2 Pós-acidificação 110

3.2.3 Avaliação da cor 112

3.3 Valor calórico do suco de melão probiótico 117

4. CONCLUSÕES 118

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118

CONCLUSÕES 122

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1		
FIGURA 1:	Micrografia de contraste de fase mostrando a diversidade morfológica de lactobacilos	08
FIGURA 2:	Esquema generalizado do metabolismo fermentativo de bactérias ácido-láticas	10
FIGURA 3:	Aspecto colonial em ágar MRS (3a) e microscópico (3b) de *L. casei* NRRL B-442	11
FIGURA 4:	Estratégia para a seleção de micro-organismos probióticos	15
FIGURA 5:	Aspecto da casca e polpa de melão *Cantaloupe*	24
FIGURA 6:	Cavitação ultra-sônica	27
CAPÍTULO 2		
FIGURA 1:	Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis independentes no crescimento de *L. casei* em suco de melão fermentado	52
FIGURA 2:	Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis independentes na viabilidade de *L. casei* em suco de melão fermentado	53
FIGURA 3:	Gráfico de superfície de resposta para a otimização do crescimento de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado	55
FIGURA 4:	Gráfico de superfície de resposta para a otimização da viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado	56
CAPÍTULO 3		
FIGURA 1:	Desruptor de células ultra-sônico (1a) e macro ponta de titânio utilizada (1b)	63
FIGURA 2:	Efeitos estimados sobre a atividade da enzima peroxidase	74
FIGURA 3:	Superfície de resposta para a atividade residual da enzima peroxidase (POD)	76
FIGURA 4:	Efeitos estimados da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO)	78
FIGURA 5:	Efeito da potência e do tempo de tratamento na inativação da enzima polifenoloxidase (PPO)	80
FIGURA 6:	Efeitos estimados sobre a atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APx)	82
FIGURA 7:	Efeito da potência e do tempo de tratamento na inativação da enzima peroxidase do ascorbato (APx)	83
FIGURA 8:	Efeito da intensidade ultra-sônica na estabilidade do suco de melão controle e sonificado (372,93 W/cm^2/10min)	86
FIGURA 9:	Aspecto do suco de melão controle e sonificado	86

CAPÍTULO 4

FIGURA 1:	Obtenção do suco de melão probiótico	98
FIGURA 2:	Perfil de crescimento de *L. casei* em suco de melão sonificado	103
FIGURA 3:	Contagem de células viáveis de *L. casei* B-442 em suco de melão sonificado	104
FIGURA 4:	Consumo de açúcares do suco de melão por *L. casei* B-442 ao longo da fermentação	105
FIGURA 5:	Produção de ácido lático por *L. casei* B-442 ao longo da fermentação	105
FIGURA 6:	Consumo de açúcares durante a estocagem refrigerada do suco de melão fermentado por *L. casei* B-442 sem adição de açúcar (6a) e com açúcar (6b)	108
FIGURA 7:	Comparação do número de células viáveis dos sucos com e sem adição de açúcar	109
FIGURA 8:	Produção de ácido lático (g/L) durante a estocagem refrigerada de suco de melão fermentado por *L. casei* B-442 sem adição de açúcar (8a) e com açúcar (8b)	111
FIGURA 9:	Contagem de células viáveis e pós-acidificação de *L. casei* B-442 ao longo da estocagem refrigerada do suco de melão sem adição de açúcar (9a) e com açúcar (9b)	112
FIGURA 10:	Valores de luminosidade de suco de melão fermentado e armazenado sem açúcar (●), com açúcar (■) e controle (◆) durante estocagem refrigerada	113
FIGURA 11:	Ângulo de tonalidade de suco de melão fermentado e armazenado sem açúcar (●), com açúcar (■) e controle (◆) durante estocagem refrigerada	115
FIGURA 12:	Valores de cromaticidade de suco de melão fermentado e armazenado sem açúcar (●), com açúcar (■) e controle (◆) durante estocagem refrigerada	116
FIGURA 13:	Aspecto visual do suco de melão fermentado por *L. casei* B-442	118

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1		
QUADRO 1:	Bactérias ácido-láticas utilizadas como probióticos	07
QUADRO 2:	Informações sobre a linhagem de *L. casei* utilizada neste estudo	12
QUADRO 3:	Teores de minerais e aminoácidos do melão *Cantaloupe*	25
CAPÍTULO 2		
TABELA 1:	Condições de operação do cromatógrafo líquido de alta eficiência	46
TABELA 2:	Constituintes e respectivos tempos de retenção do padrão utilizado nas análises cromatográficas	47
TABELA 3:	Fatores independentes e níveis utilizados para a otimização do pH e temperatura de fermentação do suco de melão por *L. casei* B-442	48
TABELA 4:	Planejamento experimental de otimização do processo de produção da bebida fermentada probiótica à base de suco de melão	48
TABELA 5:	Composição de açúcares e proteínas do suco de melão	50
TABELA 6:	Planejamento experimental e resultados obtidos para a otimização do crescimento e manutenção da viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão após 24 horas de fermentação	51
TABELA 7:	Análise de variância para o modelo de crescimento de *L. casei* em suco de melão fermentado	54
TABELA 8:	Análise de variância para o modelo de viabilidade de *L. casei* em suco de melão fermentado	55
CAPÍTULO 3		
TABELA 1:	Fatores independentes e níveis utilizados para a otimização do processo de sonificação de suco de melão	68
TABELA 2:	Planejamento experimental utilizado para otimização das condições de processamento ultra-sônico	68
TABELA 3:	Influência do tratamento ultra-sônico na variação da cor do suco melão em relação ao suco *in natura*	70
TABELA 4:	Influência do tratamento ultra-sônico na inativação da peroxidase do suco melão	73
TABELA 5:	Análise de variância para atividade residual de peroxidase	75
TABELA 6:	Influência do tratamento ultra-sônico na inativação da polifenoloxidase do suco melão	77
TABELA 7:	Análise de variância para atividade residual de polifenoloxidase	79

TABELA 8:	Influência do tratamento ultra-sônico na inativação da enzima APx do suco melão	81
TABELA 9:	Análise de variância para atividade residual de peroxidase do ascorbato (APx)	83
TABELA 10:	Influência do tratamento ultra-sônico na concentração de compostos fenólicos do suco melão	84
CAPÍTULO 4		
TABELA 1:	Condições de operação do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	101
TABELA 2:	Constituintes e respectivos tempos de retenção do padrão utilizado nas análises cromatográficas	101
TABELA 3:	Efeito da estocagem refrigerada na viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado	107
TABELA 4:	Influência da estocagem refrigerada na cor do suco melão fermentado probiótico com e sem adição de açúcar	114
TABELA 5:	Balanço energético para o cálculo do valor calórico do suco de melão probiótico	117
TABELA 6:	Valor calórico de bebidas lácteas probióticas disponíveis no mercado	117

RESUMO

FONTELES, Thatyane Vidal. **Desenvolvimento de uma nova bebida funcional probiótica à base de suco de melão *Cantaloupe* sonificado.** 2011. 133f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

A utilização de sucos de frutas para o desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos tem sido uma alternativa de consumo para indivíduos que não querem ou não podem fazer uso de produtos lácteos fermentados. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida com propriedades probióticas à partir da fermentação do suco de melão *Cantaloupe* por *Lactobacillus casei* NRRL B-442. A primeira etapa da pesquisa consistiu na otimização de parâmetros de pH e temperatura de fermentação para o desenvolvimento de *L. casei* no suco de melão. Os resultados mostraram que a linhagem probiótica estudada apresentou potencial fermentativo em suco de melão, não havendo necessidade de suplementação com nutrientes para a obtenção de valores adequados de pH e número de células viáveis. A melhor condição encontrada que garantisse um bom crescimento do micro-organismo além de assegurar a viabilidade celular necessária para que o produto seja considerado probiótico foi a temperatura de 31°C com o pH inicial do suco de 6,1. Neste trabalho foi demonstrada a vantagem tecnológica do uso de suco de melão como substrato para a fermentação probiótica uma vez que o pH natural do suco proporcionou um meio favorável para o desenvolvimento do micro-organismo. Em uma segunda etapa, investigou-se o efeito do tratamento ultra-sônico nos parâmetros de qualidade do suco de melão em função da intensidade de energia ultra-sônica e do tempo de tratamento. O processamento ultra-sônico utilizando intensidade de 372,93 W/cm^2 durante 10 minutos melhorou as características de qualidade do suco reduzindo a atividade de enzimas deteriorantes, aumentando a homogeneidade sem causar danos à cor do produto. Considerando estes resultados, na terceira etapa da pesquisa foram estudadas a cinética da produção de suco de melão sonificado probiótico e a influência da estocagem sob refrigeração em parâmetros de qualidade da bebida como: sobrevivência de *L. casei*, pós-acidificação e cor. O suco de melão foi submetido ao processamento ultra-sônico, inoculado com 1% (v/v) da cultura e incubado a 31ºC por 8 horas. Os sucos foram armazenados sob refrigeração a 4°C. Foram determinados pH e parâmetros de cor da bebida, crescimento celular e o número de células viáveis. As análises foram realizadas em intervalos de 7 dias, até o 42º dia de estocagem. A maior contagem celular foi atingida nas 12 horas do estudo, chegando a 9,0 log UFC/mL, porém a partir de 8ª hora não houve um aumento significativo da concentração de células viáveis, motivo pelo qual elegeu-se 8 horas como o tempo de fermentação ideal para a elaboração do suco de melão probiótico. Durante a estocagem refrigerada, houve produção de ácidos e uma discreta redução do número de células viáveis, porém o produto manteve prevalência de células viáveis (com índices acima do preconizado pela legislação vigente), durante 42 dias de armazenamento a 4°C, independentemente de terem sido estocadas com ou sem açúcar sem prejuízos à coloração do produto. O suco de melão foi considerado um veículo adequado para a ingestão de micro-organismos probióticos, pois apresentou contagem de células viáveis superior a 8 log UFC/mL durante todo o período de estudo.

Palavras-chave: Suco probiótico. *Lactobacillus casei*. ultra-som. melão *Cantaloupe*

ABSTRACT

FONTELES, Thatyane Vidal. **Development of a new probiotic functional drink based of ultrasonicated *Cantaloupe* juice.** 2011. 133f. Dissertation – (Master on Food Science and Technology). Federal University of Ceará, Fortaleza.

The use of fruit juices for the development of functional foods has been an alternative for people who do not want or cannot make use of fermented dairy products. The objective of this research was the development of a drink with probiotic properties trough the fermentation of melon juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. The first stage of the work consisted of the optimization of pH and temperature of fermentation for the *L. casei* cultivation in melon juice. Results showed that this strain has fermentative potential in melon juice, with no need of nutrient supplementation to reach the appropriated values of pH and viable cells. The best operating condition found to guarantee a good growth of the microorganism and ensure the cellular viability necessary for the product to be considered probiotic was the temperature of 31°C with initial pH of 6.1. The technological advantage of using melon juice as a substrate for probiotic fermentation was demonstrated in this work because the natural pH of the juice provided a favorable environment for the probiotic microorganism development. In a second stage, the effect of ultrasound treatment on quality parameters of melon juice was investigated as a function of intensity of ultrasonic energy and treatment time. The ultrasonic processing intensity using 372.93 W/cm^2 for 10 minutes improved the quality of the juice reducing the spoilage due to enzyme activity, increasing homogeneity without damaging the product color. In the third phase of the research, the kinetics of probiotic melon juice fermentation and the influence of the product storage under refrigeration on the beverage quality parameters such as survival of *L. casei*, post-acidification and color were studied. The melon juice was subjected to ultrasonic processing (372.93 W/cm^2/10min) and inoculated with 1% (v/v) and incubated at 31°C for 8 hours. The fermented juice was stored at 4°C, and pH, color, cell biomass, and viable cells number were evaluated. Analyses were performed at intervals of 7 days until 42 days of storage. The highest cell count was achieved within 12 hours of study, reaching 9.0 log CFU/mL, but from the 8th of fermentation there was no significant increase in the concentration of viable cells. Thus, 8 hours was elected as the optimal fermentation time to prepare the probiotic melon juice. During refrigerated storage there was acid production and a slight reduction in the number of viable cell. However, the product kept the number of viable cells above the level recommended by the current legislation during 42 days of storage at 4°C, regardless of having been stocked sugar-free or with sugar addition and no damage to the product color was observed. Melon juice was considered a good vehicle for probiotic microorganism as it showed viable cell count higher than 8 log CFU/mL throughout the studied period.

Keywords: Probiotic juice. *Lactobacillus casei*. ultra-sound. *Cantaloupe* melon

INTRODUÇÃO

Uma tendência que se fortalece no mercado mundial de alimentos é o consumo de itens funcionais. É o caso, por exemplo, dos alimentos que contêm culturas probióticas. A Organização Mundial de Saúde define os probióticos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Atualmente, a pesquisa com micro-organismos probióticos encontra-se voltada principalmente para produtos como leites fermentados e iogurtes, que são os principais produtos comercializados no mundo contendo culturas probióticas. No entanto, a intolerância à lactose, a alergia às proteínas do leite e o alto teor de colesterol são inconvenientes frequentemente relacionados ao consumo de produtos lácteos fermentados. Vale salientar, também, o número crescente de adeptos ao vegetarianismo como um fator determinante na pesquisa de novos alimentos probióticos (NAZZARO et al., 2008; PRADO et al., 2008; YOON; WOODANS; HANG, 2005).

Os sucos de frutas podem representar um substrato ideal para fermentação com culturas probióticas, porque são ricos em componentes funcionais, além de possuírem características sensoriais atrativas, tornando-os bem aceitos e consumidos frequentemente por ampla parcela da população (LUCKOW et al., 2006).

No entanto, alguns desafios tecnológicos precisam ser superados para a incorporação de culturas probióticas em sucos de frutas. Diversos autores afirmam que a adição de probióticos em sucos é mais complexa do que em produtos lácteos, uma vez que as bactérias precisam de proteção adicional contra as condições ácidas dos sucos de frutas sendo necessária a seleção criteriosa de cepas resistentes às condições ácidas a que são submetidas (KLEWICKA; MOTYL; LIBUDZISZ, 2004; NAZARRO et al., 2008; PRADO et al., 2008).

Apesar da limitação tecnológica, os sucos de frutas são substratos viáveis para o desenvolvimento de cepas probióticas. Diversos exemplos bem sucedidos na literatura foram reportados (COELHO, 2009; COSTA et al., 2010; KLEWICKA; ZDŬHCZYK; JUŚKIEWICZ, 2009; KUN et al., 2008; NEVES, 2005; MOUSAVI et al., 2010; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011).

Dentre os frutos cultivados no Nordeste brasileiro, o melão é apontado como cultura de destaque, principalmente nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Os melões pertencentes ao grupo *Cantaloupensis* possuem boa qualidade comercial, alto valor nutritivo, destacando-se como uma excelente fonte de vitamina A (HOMNAVA; ROGERS; EITENMILLER, 1990). Esse grupo é comercializado no mercado externo a preços elevados, representando o principal grupo de melão consumido no Hemisfério Norte (GOMES JÚNIOR et al., 2001).

Logo, considerando a elevada importância econômica da cultura do melão para a região Nordeste e seu apelo popular, não somente pelo sabor, mas pelas propriedades terapêuticas e que os veículos de alimentos probióticos ainda se encontram muito restritas aos produtos lácteos, neste trabalho foi desenvolvido um novo alimento com propriedades probióticas a partir de suco de melão *Cantaloupe* e *Lactobacillus casei* NRRL B-442.

O trabalho será apresentado na forma de artigos divididos nos seguintes capítulos:

Capítulo 1: Apresenta um embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho com ênfase na definição dos alimentos funcionais probióticos, metabolismo das bactérias ácido-láticas, alegações funcionais atribuídas aos alimentos probióticos, efeitos de culturas probióticas sobre características tecnológicas, uso dos sucos de frutas como veículos de culturas probióticas e finalizando com uma revisão sobre a tecnologia ultra-sônica;

Capítulo 2: Esta seção teve como objetivos a otimização do pH e temperatura de crescimento e manutenção da viabilidade de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 em suco de melão;

Capítulo 3: O capítulo 3 versa sobre o estudo de otimização do processamento ultra-sônico de suco de melão, e suas implicações nas características de qualidade do mesmo;

Capítulo 4: Por fim, o capítulo 4 aborda a influência da estocagem refrigerada na estabilidade físico-química e microbiológica da bebida fermentada. O objetivo foi determinar a vida de prateleira do suco probiótico com base nas suas características de qualidade e na viabilidade do micro-organismo durante o armazenamento.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Alimentos funcionais probióticos

De acordo com o conceito tradicional de nutrição, o principal papel dos alimentos é prover a quantidade adequada de nutrientes para suprir as necessidades energéticas básicas e manter a saúde do indivíduo. No entanto, estudos clínicos e epidemiológicos têm revelado ao longo dos anos que certos tipos de alimentos e/ou componentes alimentícios específicos podem afetar uma variedade de funções no organismo e promover a saúde (FAO/AGNS, 2007). Diante das evidências científicas que destacam os alimentos como agentes promotores da saúde, têm-se intensificado a pesquisa e o desenvolvimento de alimentos que apresentem propriedades funcionais.

Um alimento pode ser considerado funcional quando, além do papel básico de nutrir, também conter em sua composição alguma substância biologicamente ativa que, ao ser consumido em uma dieta usual, desencadeia processos metabólicos ou fisiológicos, resultando em redução do risco de doenças e manutenção da saúde (ANJO, 2004; MACHADO, 2007).

No contexto dos alimentos funcionais, estão inseridos aqueles que contêm culturas probióticas. Os probióticos são definidos, segundo a Organização Mundial de Saúde, como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

O conceito de que bactérias poderiam trazer benefícios à saúde surgiu no início do século XX, quando o microbiologista Elie Metchnikoff associou o consumo de produtos fermentados derivados de leite contendo bactérias viáveis à longevidade da população dos Balcãs (TWETMAN; STECKSÉN-BLICKS, 2008). Desde então, vários pesquisadores têm procurado conhecer e caracterizar as funções dos micro-organismos benéficos para a saúde que habitam o trato digestivo, mais precisamente em produtos lácteos fermentados (AMORES et al., 2004; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; SHORTT, 1999).

Uma microbiota intestinal saudável e equilibrada resulta em um desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, o que irá assegurar melhoria na qualidade de vida do indivíduo. No campo da nutrição preventiva, o papel direto dos micro-organismos probióticos no sentido de propiciar uma microbiota intestinal saudável e equilibrada ao hospedeiro já está bem estabelecido (SAAD, 2006). A

influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

O reconhecimento por parte da população dos benefícios advindos do consumo de micro-organismos específicos tem fortalecido uma tendência mundial crescente de consumo de alimentos funcionais contendo probióticos. Como consequência, vários avanços nas pesquisas de desenvolvimento de novos produtos resultam na incorporação de probióticos em diversos setores alimentícios como: lacticínios, bebidas, cereais e até mesmo em produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

2. Bactérias Ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas (BAL) compreendem a classe mais representativa dos micro-organismos probióticos constituindo um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, largamente utilizadas para a produção de alimentos fermentados, que têm em comum características metabólicas e morfofisiológicas.

Com relação à morfologia, as bactérias pertencentes a este grupo podem existir na forma de cocos ou bastões regulares. Não formam endosporos, geralmente não produzem catalase, são quimiorganotróficas fastidiosas e podem se desenvolver sob condições estritamente anaeróbias ou microaerófilas (SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004; STILES; HOLZAPFEL, 1997). Contudo, exceções desta descrição geral ocorrem devido algumas espécies poderem formar catalase ou citocromos em meio contendo hematina ou compostos relacionados. A produção de uma catalase não-heme, denominada pseudocatalase[1], por alguns lactobacilos também causa alguma confusão na identificação de bactérias ácido-láticas (HOLZAPFEL et al., 2001[a]).

Geralmente, as BAL não possuem sistema citocromo e são incapazes de utilizar o oxigênio como aceptor de elétrons. Ao invés disso, estas bactérias produzem ácido lático como principal produto final durante a fermentação de carboidratos simples. O ácido lático produzido pode ser L (+), com menos

[1] A “pseudocatalase” difere da catalase por não apresentar grupo heme e pela resistência ao cianeto e à azida (SHARPE, 1979 *apud* MENDES-FAIA, 1987).

frequência, D (-), ou ainda uma mistura de ambos (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). A acidez resultante inibe as bactérias competidoras, criando um nicho ecológico favorável ao estabelecimento das BAL em um determinado ecossistema (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Adicionalmente algumas BAL também produzem peptídeos antagônicos a outras bactérias gram-positivas (MADERA et al., 2003). Esta característica é a base do método de biopreservação de alimentos por fermentação.

As bactérias ácido-láticas são basicamente mesófilas, com exceção de algumas linhagens termófilas, e são capazes de crescer em temperaturas que variam entre 5°C e 45°C (FORSYTHE, 2007). Estes micro-organismos podem sobreviver em um pH relativamente baixo (3,5), diferentemente de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório (SMULDERS et al., 1986). Elas possuem um sistema de transporte simultâneo de ácido lático e de prótons para o exterior da célula, que além de contribuir para a homeostase do pH interno, fornecem energia (TSENG; MONTVILLE, 1993).

As BAL são largamente distribuídas na natureza associadas a ambientes ricos em nutrientes como os alimentos fermentados (leite, carnes, vegetais etc), plantas, silagens, esgotos e os tratos intestinal, genital e respiratório de mamíferos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

Os gêneros mais representativos do grupo são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998). Com exceção de *Bifidobacterium*, todos os gêneros citados são bactérias Gram-positivas com um baixo conteúdo (<50%) G+C (guanina+citosina). Apesar da pouca relação filogenética e do modo peculiar de fermentação de carboidratos que possui, o gênero *Bifidobacterium* também é considerado dentro do grupo das BAL por possuir características fisiológicas e bioquímicas assim como nichos ecológicos comuns aos demais gêneros do grupo (SCHLEIFER; LUDWIG, 1995).

As bactérias ácido-láticas são as maiores representantes dos probióticos tanto no mercado alimentício como no farmacêutico (Quadro 1) sendo os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* os mais frequentemente empregados com esse propósito, uma vez que eles têm sido isolados de todas as porções do trato gastrintestinal do humano saudável (SAAD, 2006).

Quadro 1: Bactérias ácido-láticas utilizadas como probióticos*

Gênero	Espécie	
Lactobacillus	*L. acidophilus*	*L. amylovorus*
	L. bulgaricus	*L. gasseri*
	L. johnsonii	*L. plantarum*
	L. reuteri	*L. rhamnosus* GG
	L. salivarum	*L. casei*
Bifidobacterium	*B. adolescentis*	*B. animalis*
	B. bifidum	*B. brevis*
	B. infantis	*B. longum*
	B. lactis	
Streptococcus	*S. thermophilus*	*S. salivarus*
Enterococcus	*E. faecium*	

* Adaptada de KLAENHAMMER; KULLEN (1999) eTANNOCK (1995).

Dentre as bactérias ácido-láticas, o grupo *Lactobacillus casei* compreende linhagens fenotipicamente e geneticamente heterogêneas, capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes. Destacam-se nesse grupo os lactobacilos típicos do hospedeiro humano, os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae* (HOLZAPFEL et al., 2001[b]; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

2.1 Gênero *Lactobacillus*

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são bastonetes Gram-positivos de longitude variada (Figura 1), anaeróbios, porém aerotolerantes, imóveis e não formadores de esporos. São micro-organismos fastidiosos que necessitam de vitaminas do complexo B como lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e ácido fólico, além de vários aminoácidos para o crescimento (JAGNOW; DAWID, 1991).

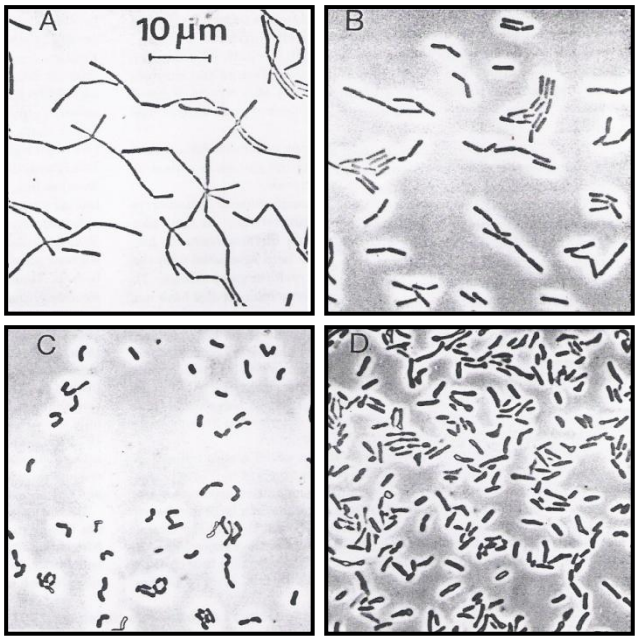


Figura 1: Micrografia de contraste de fase mostrando a diversidade morfológica de lactobacilos. **A**. *Lactobacillus gasseri*; **B**. *Lactobacillus agilis*; **C**. *Lactobacillus curvatus*; **D**. *Lactobacillus minor* (KANDLER; WEISS, 1986).

As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus,* crescem em temperaturas que variam de 2 a 53 °C, com valores ótimos, geralmente de 30 a 40 °C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2 podendo se desenvolver em pH 5,0 ou menor. O crescimento é frequentemente reduzido em meios neutros ou alcalinos (KANDLER; WEISS, 1986).

Os lactobacilos habitam vários nichos ecológicos distribuídos pelos tratos gastrintestinal e geniturinário, constituindo uma fração importante da microbiota nativa de mamíferos. Tal distribuição pode ser afetada por vários fatores ambientais incluindo o pH, a disponibilidade de oxigênio, o nível de substratos específicos ou ainda a ocorrência de interações bacterianas (GOMES; MALCATA, 1999).

2.1.1 Metabolismo

O Manual Bergey de sistemática bacteriana descreve o gênero *Lactobacillus* como um grupo heterogêneo de 'bastonetes regulares, Gram-positivos e não-esporulados' (KANDLER; WEISS, 1986).

O gênero *Lactobacillus* inclui cerca de 80 espécies reconhecidas que são classicamente divididas baseadas em suas características fermentativas (AXELSSON, 2004):

Grupo 1: Homofermentativos;
Grupo 2: Heterofermentativos facultativos;
Grupo 3: Heterofermentativos obrigatórios.

Vários lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos facultativos e alguns heterofermentativos obrigatórios são utilizados em alimentos fermentados. Porém, esse último grupo é comumente associado à deterioração de alimentos (VÁSQUEZ et al., 2005).

As bactérias homofermentativas produzem ácido lático à partir do metabolismo de açúcares pela via glicolítica (Figura 2). O piruvato é convertido diretamente a ácido lático através da enzima lactato desidrogenase (VÁSQUEZ et al., 2005).

Os heterofermentativos obrigatórios incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, dentre outros produtos sendo que a produção de gás a partir da glucose é uma característica marcante dessas bactérias (VÁSQUEZ et al., 2005). São exemplos desse grupo as espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* (AXELSSON, 2004; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

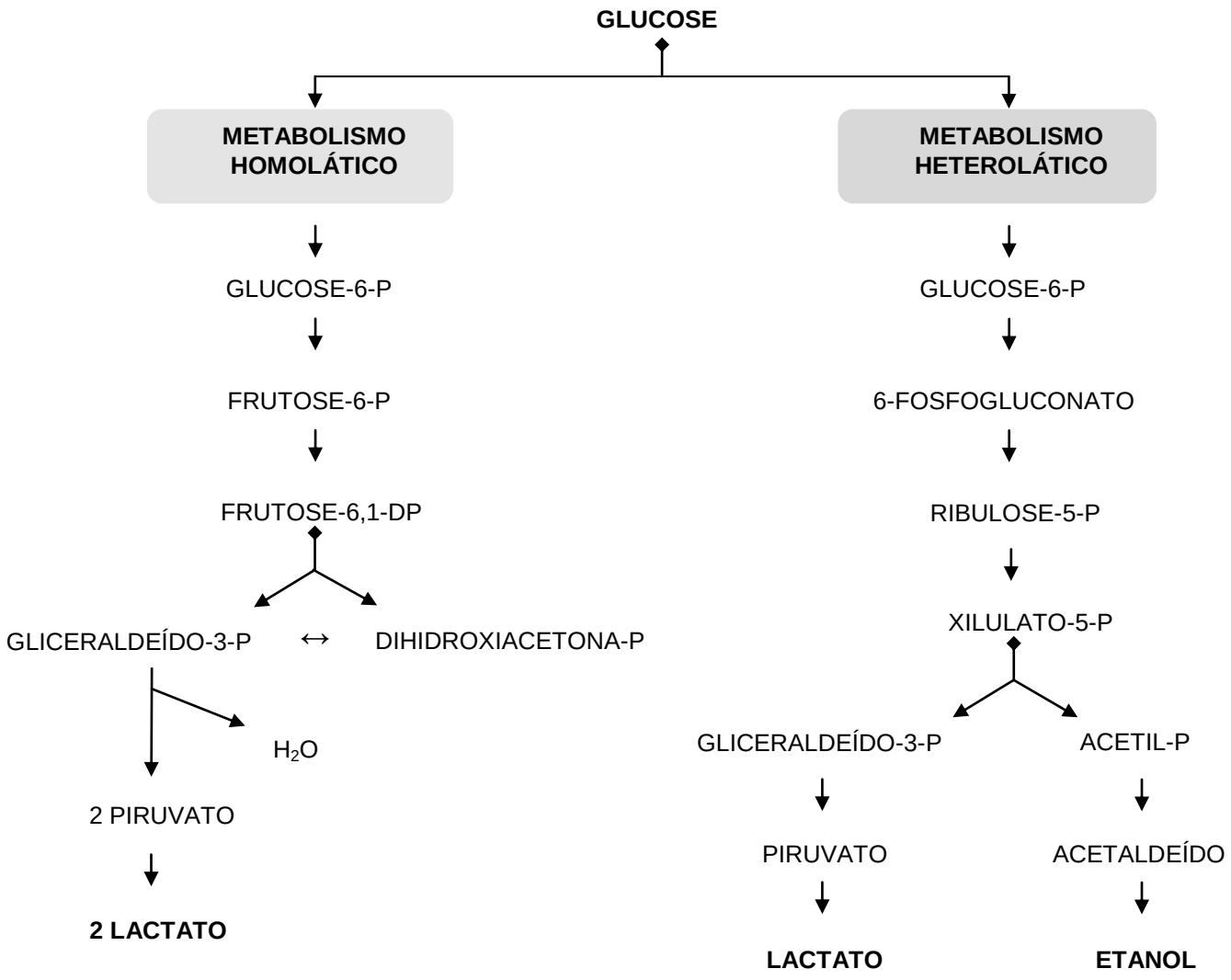


Figura 2: Esquema generalizado do metabolismo fermentativo de bactérias ácido-láticas (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

As bactérias heterofermentativas utilizam a via fosfoaldolase, ou via das pentoses para a fermentação das hexoses (WISSELINK et al., 2002) e produzem quantidades equimolares de ácido lático, ácido acético, dióxido de carbono, etanol, diacetil e manitol, dentre outros (COGAN; JORDAN, 1994). Entretanto, essas quantidades podem variar de acordo com os fatores ambientais tais como: tipo de substrato, quantidades de substrato disponível, pH do meio de cultura e temperatura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Por outro lado, as bactérias ácido-láticas homofermentativas produzem 2 mols de ácido lático através da fermentação de hexoses, inclusive frutose (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Os heterofermentativos facultativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido lático e podem produzir gás a partir de gluconato, mas não através da glucose. Esses micro-organismos também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos lático e acético (AXELSSON, 2004; VÁSQUEZ et al., 2005).

O grupo "*Lactobacillus casei*" é formado por espécies de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*. Estes micro-organismos possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos (FELIS et al., 2001; FERRERO et al., 1996; VÁSQUEZ et al., 2005). Gomes e Malcata (1999) enfatizam que as espécies mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*.

2.1.2 *Lactobacillus casei* NRRL B-442

Lactobacillus casei NRRL B-442 é um bacilo curto Gram-positivo, formador de colônias redondas, cor branco cremoso, com diâmetro aproximado de 0,9 a 1,5 mm (Figura 3), não patogênico e seguro do ponto de vista alimentar que apresenta bom crescimento em substratos alimentares (COELHO, 2009; COSTA et al., 2010; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; SILVEIRA et al., 2010).

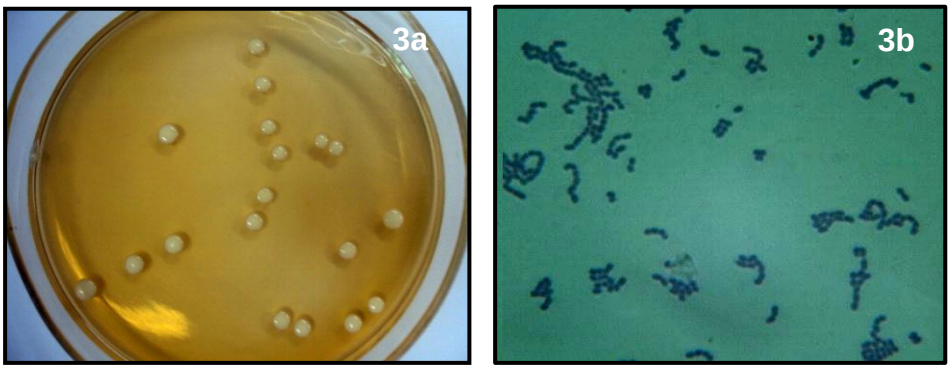


Figura 3: Aspecto colonial em ágar MRS (3a) e microscópico (3b) de *L. casei* NRRL B-442.

Características adicionais da referida cepa são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2: Informações sobre a linhagem de *L. casei* NRRL B-442 utilizada neste estudo (ARS, 2010)

Sinonímia	*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* *Lactobacillus helveticus*		
Número de acesso em outras coleções de culturas	ATCC 7469=BCRC	10940=CCM	1825=CCUG
	21452=CECT	278=CIP	A157=DSM
	2001=DSM	20021=IAM	1118=IFO
	3425=JCM	1136=KCTC	1046=LMG
	6400=NBRC	3425=NCDO	243=NCFB
	243=NCIMB	6375=NRIC	1043=NRRL
	B-176=VKM	B-574=Wis bc-1	
Origem	preparação farmacêutica		
Aplicações	análise de vitaminas		
Meio de crescimento	deep liver broth		
Temperatura ótima de crescimento (meio MRS)	37°C		

De acordo com o manual Bergey de sistemática bacteriana, esse micro-organismo é o único lactobacilo homofermentativo capaz de apresentar um bom crescimento tanto em 15 como em 45°C (KANDLER; WEISS, 1986).

Na literatura há estudos como os de Bautista-Garfias et al. (1999) e Martínez-Gómez et al. (2006) que comprovam o efeito benéfico à saúde de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Segundo os autores mencionados, esta linhagem possui propriedades probióticas uma vez que a mesma é capaz de sobreviver ao trato gastrintestinal, aumentar a resistência a infecções parasitárias e provoca um aumento da regulação dos níveis de intérferon gama (IFNγ) [2].

[2] Em macrófagos, IFN-y é um potente agente de regulação da resposta fagocitária, capaz de suprimir a síntese de proteínas citoplasmáticas envolvidas com a replicação viral, ativar o fator de transcrição NF-KB envolvido com respostas inflamatórias de defesa e induzir a expressão de óxido nítrico e de oxidases responsáveis pela foflilação de espécies reativas de oxigênio (SEADI, 1998).

Saito, Watanabe e Tado (1980) reportaram que o micro-organismo em questão exibe proteção efetiva contra *Escherichia coli*.

3. Alegações funcionais atribuídas aos micro-organismos probióticos

Diversos dados científicos demonstram os benefícios potenciais de promoção da saúde como resultado da ingestão de probióticos que incluem o alívio dos sintomas da intolerância à lactose (MARTEAU; BOUTRON-RUAULT, 2002); a redução dos níveis de colesterol (PATEL et al., 2009) e o controle de infecções gastrintestinais causados por vírus (COLBÈRE-GARAPIN et al., 2007), parasitas (BAUTISTA-GARFIAS et al., 1999) ou bactérias (SHAH, 2007). Saad (2006) atribui a melhora da intolerância à lactose, através do uso de probióticos, ao fato deles produzirem a enzima β-D-galactosidade, auxiliando a hidrólise da lactose no intestino.

Quanto ao efeito probiótico benéfico sobre a concentração sanguínea de lipídios, apesar de poucos estudos clínicos terem sido realizados, todos mostraram que a ingestão de probióticos exerceu influência sobre os lipídios de uma maneira similar, reduzindo os níveis de colesterol total, da fração LDL e de triglicerídios (KOPP-HOOLIHAN, 2001 *apud* SAAD, 2006). Fooks, Fuller e Gibson (1999) acrescentam que os probióticos podem assimilar diretamente o colesterol ou interferir na sua absorção intestinal, o que levaria à redução das suas taxas.

Ao colonizar a mucosa intestinal, os micro-organismos probióticos inibem o desenvolvimento de bactérias patogênicas por mecanismos de exclusão competitiva que incluem: a) competição por sítios de ligação (promovem o bloqueio dos sítios e/ou receptores na mucosa entérica, reduzindo a área de interação das bactérias patogênicas); b) produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e ácido lático); c) competição por nutrientes e d) metabolismo acelerado de nutrientes específicos (açúcares, vitaminas e aminoácidos são metabolizados e tornam-se indisponíveis aos patógenos) (AMORES et al., 2004; DRISKO; GILES; BISCHOFF, 2003; ESCALANTE, 2001; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; MITSUOKA, 1978; PENNA et al., 2000).

Calderón et al. (2007), ao avaliarem o efeito antimicrobiano de diferentes micro-organismos probióticos observaram efeito antagônico sobre populações de

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*. Assim reafirmam que a utilização de micro-organismos com propriedades funcionais nos alimentos pode contribuir com a segurança alimentar.

A eficácia do uso de probióticos como terapia adjuvante no tratamento de *Helicobacter pylori,* bactéria causadora de distúrbios como gastrite tipo B, úlceras pépticas e câncer gástrico foi demonstrada por Lesbros-Pantoflickova, Corthe´Sy-Theulaz e Blum (2007). Algumas cepas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem bacteriocinas que inibem o crescimento de *H. pylori* e sua aderência às células epiteliais.

Outros benefícios atribuídos ao consumo de probióticos são: a redução da incidência de doenças do trato urogenital (REID; BRUCE; TAYLOR, 1995) e aumento do valor nutritivo, pelo aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas do complexo B pelo micro-organismo (FAMULARO et al., 2005; POMPEI et al., 2007).

Os probióticos podem ainda apresentar atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas. Vários estudos relataram estimulação da função imunológica (CROSS et al., 2002; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2008) e supressão de câncer através do consumo desses micro-organismos (MA et al., 2010). Pesquisas têm demonstrado que os probióticos podem diminuir as concentrações fecais e atividades de certas enzimas, como β-glucuronidase, azorreductase e nitrorredutase, que estão envolvidos na ativação de agentes mutagênicos (COMMANE et al., 2005; ORRHAGE et al., 1994) e diminuição de sais biliares secundários, que podem estar envolvidos no desenvolvimento de câncer de cólon (GONET-SURAWKA; STRUS; HECZKO, 2007; WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001).

Maslowski et al. (2009) comprovou, em sua pesquisa, que os ácidos graxos de cadeia curta, produtos do metabolismo das bactérias probióticas, atuam em uma molécula do organismo, denominada receptor GPR43, facilitando o controle de inflamações.

Para atuarem como agentes terapêuticos efetivos, os micro-organismos probióticos usados como suplementos ou em alimentos devem possuir algumas características que lhes permitam colonizar a mucosa intestinal (Figura 4). Pode-se citar, dentre outros fatores: ser de origem humana e inócuos (status GRAS [3]),

[3] *Generally recognized as safe* – Reconhecidamente seguros.

possuir tolerância aos ácidos e à bile durante passagem pelo trato intestinal, capacidade de aderência, habilidade de colonização, atividade antagonista aos patógenos entéricos e resistência a antibióticos (AMORES et al., 2004; BROMBERG, 2003; MITSUOKA, 1978; SAAD, 2006).

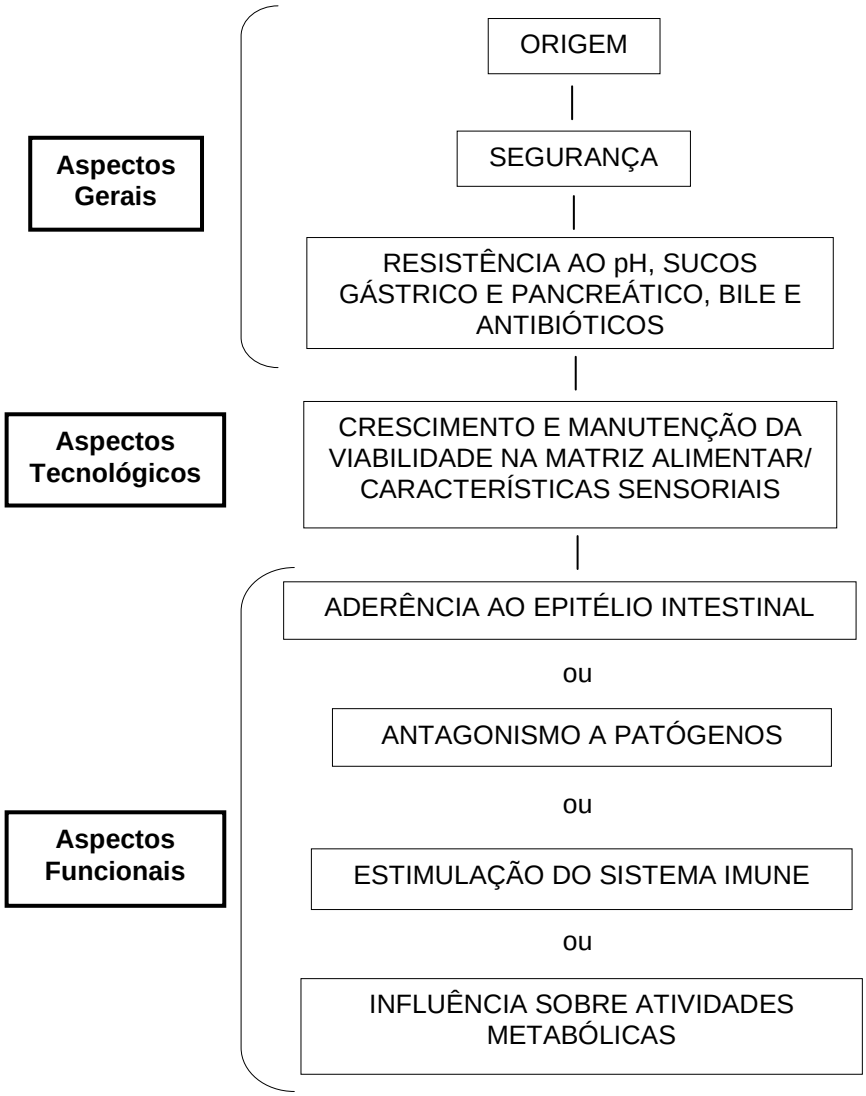


Figura 4: Estratégia para a seleção de micro-organismos probióticos (Adaptado de SANDERS; HUIS IN'T VELD, 1999).

É importante enfatizar que os efeitos benéficos à saúde são específicos de cada cepa probiótica e que não existe uma única cepa capaz de prover, concomitantemente, todos os benefícios mencionados (SHAH, 2007). O potencial probiótico pode diferir até mesmo para diferentes cepas de uma mesma espécie. Cepas de uma mesma espécie são incomparáveis e podem possuir áreas de

aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e seus mecanismos de ação sobre a mucosa saudável e a inflamada podem ser distintos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004).

A quantidade e frequência de consumo de probióticos necessários para assegurar os benefícios funcionais a eles atribuídos dependerão da linhagem do micro-organismo em questão e do efeito biológico desejado (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). De maneira geral, preconiza-se uma concentração mínima de células viáveis de 10^6-10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro do produto, equivale a uma ingestão diária de 100g ou 100mL de produto contendo 10^8-10^9 UFC para que se obtenha número relevante desses micro-organismos na composição da microbiota intestinal (ANTUNES et al., 2007; CRUZ et al., 2009; BROMBERG, 2003; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2008) a quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Tal valor equivale a 8-9 log UFC por porção do produto.

4. Aspectos tecnológicos

Além dos benefícios nutricionais, os probióticos podem também contribuir para a qualidade tecnológica. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no alimento-veículo, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e ser estáveis e viáveis durante o armazenamento. Além disso, com relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que essas cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo a condições de processamento como a liofilização ou secagem por “spray drying” (STANTON et al., 2003).

Os probióticos também devem sobreviver a fatores de estresse gastrintestinal e manter a sua funcionalidade dentro do hospedeiro. Os materiais de embalagem utilizados e as condições em que estão armazenados os produtos também são importantes para a manutenção da qualidade dos alimentos probióticos (WANG; YU; CHOU, 2004). Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes,

uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos (STANTON et al., 2005).

Muitos métodos têm sido aplicados para melhorar a sobrevivência das cepas probióticas durante a fabricação e armazenagem de leites fermentados e iogurtes dentre eles a liofilização, a microencapsulação e o uso de crioprotetores têm se destacados como promissores.

Prebióticos [4] também podem ajudar a sobrevivência dos organismos probióticos durante o processamento e armazenamento. Shin et al. (2000) concluíram que a viabilidade de *Bifidobacterium* spp. comercial em leite desnatado melhorou em 55,7% após 4 semanas de armazenamento refrigerado, quando frutooligossacarídeos foram adicionados. O efeito combinado de crioprotetores, microencapsulação e prebióticos foi encontrado para aumentar a viabilidade de determinadas cepas selecionadas de bactérias probióticas em iogurtes (CAPELA; HAY; SHAH, 2006).

Gomes e Malcata (1999) ressaltam que além de contribuir para melhorar o sabor do produto final, culturas probióticas possuem a vantagem de promover uma acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento.

4.1 Efeito de culturas probióticas sobre características tecnológicas

4.1.1 *Acidez*

O crescimento de bactérias ácido-láticas (BAL) é caracterizado pela produção de ácidos, que se acumulam no meio extracelular, como produtos finais da fermentação. A produção de ácidos por estes organismos cria um ambiente desfavorável para micro-organismos deteriorantes e/ou patógenos sensíveis a condições ácidas. Esta característica representa um dos mecanismos de antagonismo microbiano explorados na biopreservação de alimentos (GUCHTE et al., 2002).

[4] Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam beneficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006).

As BAL se deparam com as condições ácidas do estômago ao serem consumidas, e o desenvolvimento de produtos probióticos gerou o interesse na sobrevivência de bactérias ácido-láticas durante a passagem pelo trato gastrintestinal (GUCHTE et al., 2002).

Yoon et al. (2004) comentam que os principais fatores para a redução da viabilidade dos organismos probióticos são a redução do pH do meio e o acúmulo de ácidos orgânicos como resultado da fermentação.

Os mecanismos envolvidos no estresse ocasionado pela acidez na fisiologia da célula ainda não estão completamente desvendados. Porém, é bem estabelecido que ácidos atravessem a membrana celular por difusão passiva. No citoplasma os ácidos se dissociam rapidamente em prótons que são impermeáveis à membrana celular (PRESSER; RATKOWSKY; ROSS, 1997). O acúmulo de prótons reduz o pH intracelular afetando o transporte de moléculas através da membrana, a atividade de enzimas além de causar danos às proteínas e ao DNA (GUCHTE et al., 2002).

Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007) monitoraram a sobrevivência de linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em sucos de laranja, abacaxi e mirtilo. Todos os micro-organismos testados sobreviveram maior tempo nos sucos de laranja e abacaxi quando comparado ao suco de mirtilo (pH 2,5). Porém, o pH mais ácido do suco de abacaxi (pH 3,4) resultou em um declínio mais rápido da viabilidade em relação ao suco de laranja (pH 3,6).

4.1.2 *Flavour*

Os lactobacilos contribuem com o sabor de alimentos fermentados, produzindo vários compostos voláteis, como o diacetil e seus derivados (SILVA; STAMFORD, 2000).

O conhecimento acerca dos compostos de aroma da fermentação láctea é bem estabelecido. Análises de voláteis do iogurte confirmaram ser o acetaldeído o composto responsável pelo aroma característico do iogurte (GARDINI et al., 1999). No entanto, Ott et al. (2000) enfatizaram a importância da acidez e do balanço dos mais de 60 compostos de aroma na percepção do sabor do iogurte.

O impacto sensorial de ingredientes probióticos e prebióticos não tem sido extensivamente estudado, embora esteja estabelecido que produtos adicionados

destes ingredientes apresentem perfis de sabor e aroma diferenciados dos produtos convencionais (MATTILA-SANDHOLM et al., 1999).

Os aromas produzidos por bactérias probióticas podem diferir, de acordo com o substrato de fermentação. Luckow e Delahunty (2004[a]) notaram que *off-flavours* associados à fermentação probiótica são mais pronunciados em produtos não lácteos do que em bebidas lácteas.

4.1.3 *Viscosidade*

Bactérias ácido-láticas são capazes de sintetizar biopolímeros denominados exopolissacarídeos (EPS) que possuem grande aplicabilidade na indústria de alimentos como agentes espessantes, geleificantes e estabilizantes (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Tem-se observado crescente interesse no uso de polissacarídeos produzidos por bactérias láticas, principalmente pelo fato das mesmas serem consideradas GRAS para aplicação em alimentos (DUBOC; MOLLET, 2001).

O papel que os exopolissacarídeos produzidos por BAL desempenham no metabolismo celular ainda é indefinido. Porém, a estrutura capsular pode proteger a célula contra condições ambientais desfavoráveis, como estresse osmótico, bacteriófagos, presença de compostos tóxicos ou baixas temperaturas além de permitir a adesão a superfícies sólidas e formação de biofilmes (CERNING, 1990; DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Ruas-Madiedo et al. (2006) avaliaram a funcionalidade de EPS produzidos por probióticos e concluíram que os polissacarídeos produzidos pelos probióticos estavam envolvidos na adesão destes micro-organismos à mucosa intestinal. Outro fato importante é que os EPS podem apresentar efeito benéfico à saúde através de atividades imunomoduladora, antitumoral e anticolesterolêmica (KITAZAWA et al. 1991; NAKAJIMA et al., 1992; ODA et al., 1983).

Diversos autores têm proposto que os EPS podem atuar como prebióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; KORAKLI; GÄNZLE; VOGEL, 2002; NAGAOKA et al., 1994). Alguns destes polissacarídeos possuem gluco- e/ou frutooligosacarídeos e ao serem degradados pela microbiota intestinal resultam em ácidos graxos de

cadeia curta que favorecem o desenvolvimento das bactérias benéficas do cólon intestinal.

5. Emprego de bactérias probióticas em alimentos

A indústria de alimentos lácteos, em particular, tem utilizado culturas probióticas como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos funcionais (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). Iogurtes e leites fermentados são os principais veículos de culturas probióticas disponíveis no mercado.

No entanto, o aumento da oferta de produtos lácteos probióticos e a difusão do conhecimento sobre os alimentos funcionais têm gerado uma demanda crescente por novos sabores probióticos. Sobremesas lácteas (CORRÊA; CASTRO; SAAD, 2008), sorvetes (FAVARO-TRINDADE et al., 2006), vários tipos de queijo (SONGISEPP et al., 2003; CARDARELLI, 2006; ALEGRO, 2003;), produtos cárneos (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006) e bebidas à base de soja (MACHADO, 2007), água de coco (PRADO, 2007) e frutas (COELHO, 2009; NEVES, 2005) têm sido incorporados de culturas probióticas com sucesso.

Songisepp et al. (2003) desenvolveram um queijo probiótico produzido através de uma associação de culturas *starter* e *Lactobacillus fermentum* ME-3. A linhagem probiótica mostrou-se resistente às etapas de processamento do queijo, sobrevivendo e exibindo atividades antimicrobiana e antioxidante durante a maturação e estocagem do produto. Logo após a maturação, o queijo probiótico apresentou contagens de células viáveis de *L. fermentum* da ordem de 5 x 10^7 UFC/g. No entanto, após o 24º dia de armazenamento refrigerado (6°C) houve um decréscimo significativo de viabilidade.

Em pesquisa realizada por Favaro-Trindade et al. (2006) foram avaliadas a viabilidade de diferentes bactérias probióticas em sorvete de acerola. Os probióticos mantiveram-se em concentrações de 10^6 UFC/g durante 15 dias de estocagem a -18°C em pH 4,5 o que é considerado satisfatório para que sejam observados os efeitos benéficos esperados. Esses resultados revelam características tecnológicas desejáveis em cepas probióticas como a resistência ao congelamento, agitação e à incorporação de ar no produto.

Corrêa, Castro e Saad (2008) ao estudarem o desenvolvimento de um manjar branco adicionado de micro-organismos probióticos observaram que durante o armazenamento refrigerado (4°C) dos produtos durante 28 dias, as populações médias de *Lactobacillus paracasei* aumentaram de 6,6 para 8,6 UFC/g enquanto que *Bifidobacterium longum* exibiu população média de 7,3 UFC/g de produto. Com relação à aceitação sensorial, foi observada uma tendência de melhores notas para os manjares adicionados de probióticos comparados ao manjar branco controle.

Do ponto de vista tecnológico, é bem conhecida a limitação que o leite apresenta como meio de cultura para o desenvolvimento de bactérias probióticas (GOMES; MALCATA, 1999). Apesar de ser o principal substrato para a propagação de culturas probióticas, algumas bactérias do grupo *Lactobacillus* são incapazes de se desenvolver no leite sem suplementação de nutrientes (ELLI et al., 1999). Gomes e Malcata (1999) relatam que o leite não possui aminoácidos livres nem peptídeos em concentrações suficientes para permitir o rápido desenvolvimento desses micro-organismos.

6. Sucos de frutas como veículos de culturas probióticas

Muita pesquisa em termos de probióticos encontra-se voltada para produtos como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo contendo culturas probióticas (SAAD, 2006). No entanto, a intolerância à lactose, a alergia às proteínas do leite e o alto teor de colesterol são inconvenientes relacionados ao consumo de produtos lácteos fermentados. Além disso, devido ao aumento constante no número de consumidores vegetarianos, há também um acréscimo na demanda de produtos probióticos à base de vegetais (NAZZARO et al., 2008; PRADO et al., 2008; YOON; WOODANS; HANG, 2005).

O desenvolvimento de produtos probióticos não-lácteos é um desafio para a indústria de alimentos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Sob esse ponto de vista, os sucos de frutas representam uma alternativa para a produção de alimentos funcionais, devido à grande variedade e disponibilidade em todo o mundo, assim como o seu valor nutritivo. Sucos de diversas frutas têm sido avaliados como substratos adequados para o desenvolvimento de micro-organismos probióticos

(COELHO, 2009; COSTA et al., 2010; NEVES, 2005; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; MOUSAVI et al., 2010).

Frutas são fontes abundantes de vários fitonutrientes, como vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras (MAIA et al., 2009). Do ponto de vista mercadológico, o aproveitamento do excedente da produção de frutas pode trazer uma diversificação do produto, diminuir as perdas pós-colheita e possíveis perdas econômicas no período entressafra.

Os sucos de frutas podem representar um substrato ideal para fermentação com culturas probióticas, porque são ricos em componentes funcionais, como vitaminas, fibras, minerais e compostos antioxidantes, como o ácido ascórbico, além de açúcares que estimulam o crescimento do micro-organismo. Além disso, os sucos de frutas possuem características sensoriais atrativas, tornando-os bem aceitos e consumidos frequentemente por ampla parcela da população (MATILLA-SANDHOLM et al., 2002; LUCKOW et al., 2006; DING; SHAH, 2008; NAZZARO et al., 2008).

Luckow e Delahunty (2004[b]) e Yoon, Woodans e Hang (2006) acrescentaram que os sucos de frutas não têm o inconveniente de apresentar alérgenos, como ocorre em alguns produtos lácteos, que acabam limitando o consumo do produto por certos segmentos da população. Por estas razões, os sucos de frutas e vegetais devem ser avaliados quanto à adequabilidade para o uso como veículo de culturas probióticas para humanos.

No entanto, alguns desafios tecnológicos precisam ser superados para a incorporação de culturas probióticas em sucos de frutas. Diversos autores afirmam que a adição de probióticos em sucos é mais complexa do que em produtos lácteos. As bactérias precisam de proteção adicional contra as condições ácidas dos sucos de frutas, sendo necessária a seleção criteriosa de cepas resistentes às condições ácidas a que são submetidas (KLEWICKA; MOTYL; LIBUDZISZ, 2004; NAZARRO et al., 2008; PRADO et al., 2008).

Yoon, Woodans e Hang (2006) afirmam que as bactérias *L. plantarum* e *L. delbrueckii* podem ser usadas como culturas probióticas em suco de repolho fermentado, uma vez que se mostraram resistentes à condição ácida nessa bebida, mantendo-se viáveis por várias semanas a temperatura de refrigeração.

Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007), estudaram a viabilidade de micro-organismos probióticos em sucos de laranja e abacaxi e observaram que as bactérias *L. casei, L. rhamnosus e L. paracasei* mostraram-se resistentes ao baixo pH por mais de 4 semanas de estocagem, mostrando o potencial promissor para a suplementação em sucos de frutas.

Yoon, Woodans e Hang (2004) reportaram a capacidade de linhagens de *Lactobacillus* em utilizar suco de tomate para a síntese celular e produção de ácido lático alcançando contagens de células viáveis da ordem de 10^8 UFC/mL após 4 semanas de estocagem refrigerada a 4°C.

No entanto, é sabido que sucos adicionados de probióticos têm sabores diferentes dos sucos convencionais. Estudos sensoriais preliminares têm mostrado que as culturas probióticas conferem aromas ‘medicinais’ e ‘lácteos’ quando introduzidas em sucos de frutas. No entanto, não se sabe se todas as linhagens probióticas conferem estes aromas atípicos aos produtos (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004[a]).

Apesar do impacto sensorial que a adição de probióticos pode causar nos sucos de frutas, existe um interesse genuíno na produção de bebidas funcionais fortificadas com probióticos

7. Suco de Melão

O melão atualmente é cultivado em 72 países, com um mercado mundial em torno de 1,6 milhões de toneladas/ano, com China, Turquia, Estados Unidos, Irã e Espanha respondendo por mais de 60% da produção mundial. O Brasil ocupa o 12° lugar no ranking de produção mundial (FAOSTAT, 2008).

Em termos de Brasil, o melão é, dentre as frutas tropicais de maior interesse comercial, a que tem demonstrado expansão mais significativa nas duas últimas décadas. Somente na região Nordeste, a produção de melão aumentou em 773% entre os anos de 1987 a 2009, passando de 38 mil para 332 mil toneladas anuais (IBGE, 2010). Com essa significativa expansão na oferta de melão, essa fruta tornou-se um dos mais importantes produtos do agronegócio brasileiro, conquistando espaços cada vez maiores nos mercados nacional e internacional.

De acordo com a classificação aceita atualmente, os principais melões produzidos comercialmente pertencem a dois grupos: *Cucumis melo inodorus* Naud (melão amarelo) e *C. melo cantaloupensis* Naud (melão reticulado e *cantaloupe*). No primeiro grupo, melão amarelo, os frutos são inodoros, a polpa tem coloração variando entre branca e verde clara e apresentam elevado teor de açúcares, são resistentes às condições de transporte e têm longa vida pós-colheita (AGUIAR, 2001).

O melão amarelo, por ser mais resistente aos danos mecânicos e ao ataque de patógenos, é o mais cultivado. Entretanto, existe uma tendência de ampliar o cultivo de melões nobres como o *Cantaloupe*, Gália, Orange Flesh e Charentais (BASTOS, 2004). Atualmente, o melão Gália e o *Cantaloupe* são os mais cultivados na região de Mossoró-Assu (RN), principal agropólo brasileiro produtor de melão (LIMA et al., 2005).

Os frutos pertencentes ao segundo grupo, melões *cantaloupe*, apresentam polpa de coloração alaranjada ou salmão (Figura 5), às vezes verde, com sabor adocicado, e são bastante aromáticos (BASTOS, 2004; AGUIAR, 2001), o que os torna preferidos pelos consumidores, além de apresentarem teores de vitamina A até 113 vezes maiores que os melões amarelos (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1999), porém de baixa conservação pós-colheita (BASTOS, 2004).

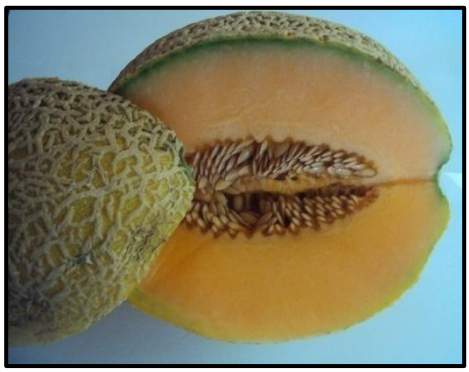


Figura 5: Aspecto da casca e polpa de melão *Cantaloupe.*

A intensidade da coloração laranja em melões *Cantaloupe* é devido principalmente a pigmentos carotenóides, dos quais o β-caroteno é o principal componente (IBDAH et al., 2006; PRATT, 1971), sendo encontrado também em

cultivares de melão de polpa alaranjada o β-criptoxantina e α-caroteno, que são precursores de vitamina A (HOMNAVA; ROGERS; EITENMILLER, 1990).

Apesar de os carotenóides não serem nutricionalmente essenciais, eles têm grande importância na dieta humana. Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado efeitos significativos relacionando a ingestão de carotenóides com a diminuição de doenças degenerativas, incluindo diversos tipos de câncer e problemas cardiovasculares (RAO; RAO, 2007). Além do papel nutricional, os carotenóides são considerados como precursores de compostos de aroma denominados apocarotenóides (GIULIANO; AL-BABILI; VON LINTING, 2003; WINTERHALTER; ROUSEFF, 2002; WINTERHALTER; SCHREIER, 1995;).

O valor nutritivo do melão *Cantaloupe* revela-se sob a forma de vitaminas, sais minerais e aminoácidos, possuindo cerca de 3.300 IU/ 100g de vitamina A (USDA, 2010), além de minerais como potássio, cálcio e fósforo e aminoácidos essenciais como a valina e a lisina (Quadro 3).

Quadro 3: Teores de minerais e aminoácidos do melão *Cantaloupe* (USDA, 2010)

Minerais	Quantidade (mg/100g)
Potássio	267
Sódio	16
Fósforo	15
Magnésio	13
Cálcio	9
Aminoácidos	Quantidade (mg/100g)
Ácido glutâmico	209
Ácido aspártico	136
Alanina	95
Serina	42
Valina	33
Lisina	30
Arginina	29

8. Tecnologia ultra-sônica aplicada ao processamento de alimentos

O melão, por suas características sensoriais, é muito apreciado e consumido, tanto no mercado interno quanto no externo. Devido às suas características intrínsecas, é um fruto que apresenta alta perecibilidade, o que resulta em uma vida útil insuficiente para permitir, sem o emprego de alguma tecnologia, a sua comercialização em mercados mais distantes (SÁ et al., 2008). No entanto, o melão e seus produtos derivados são sensíveis aos tratamentos que empregam altas temperaturas, como a esterilização. O aquecimento do suco de melão, por exemplo, resulta na produção *off-flavours* além da degradação de vitaminas e compostos aromáticos (HAYASHI; BALNEY 1996).

O processamento ultra-sônico, também denominado sonicação, é uma tecnologia não térmica que tem se mostrado eficaz na inativação de micro-organismos (GUERRERO; LOPEZ-MALO; ALZAMORA, 2001; LOPEZ-MALO; GUERRERO; ALZAMORA, 1999) e enzimas (LÓPEZ et al., 1994; LÓPEZ; BURGOS, 1995[a], 1995[b]; VERCET; LOPEZ; BURGOS, 1997; VILLAMIEL; DE JONG, 2000) relacionados a sucos de frutas, permitindo dessa maneira, o tratamento de alimentos termossensíveis (HUNTER et al., 2008).

Os efeitos provocados pelo ultra-som ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultra-sônicas de baixa frequência (< 1 MHz).

Durante a etapa de compressão a pressão é positiva, enquanto que a expansão resulta em “vácuo”, chamado de pressão negativa, constituindo-se em um ciclo de compressão-expansão que gera as cavidades. Ciclos periódicos de compressão e expansão causam o aumento do tamanho das cavidades. A cavidade, ao atingir um tamanho crítico, implode, liberando grande quantidade de calor (5.000 K) e pressão (1000 atm) em um curto período de tempo e em pontos localizados (O’DONNELL et al., 2010; SUSLICK, 1989). A Figura 6 apresenta uma representação esquemática deste fenômeno.

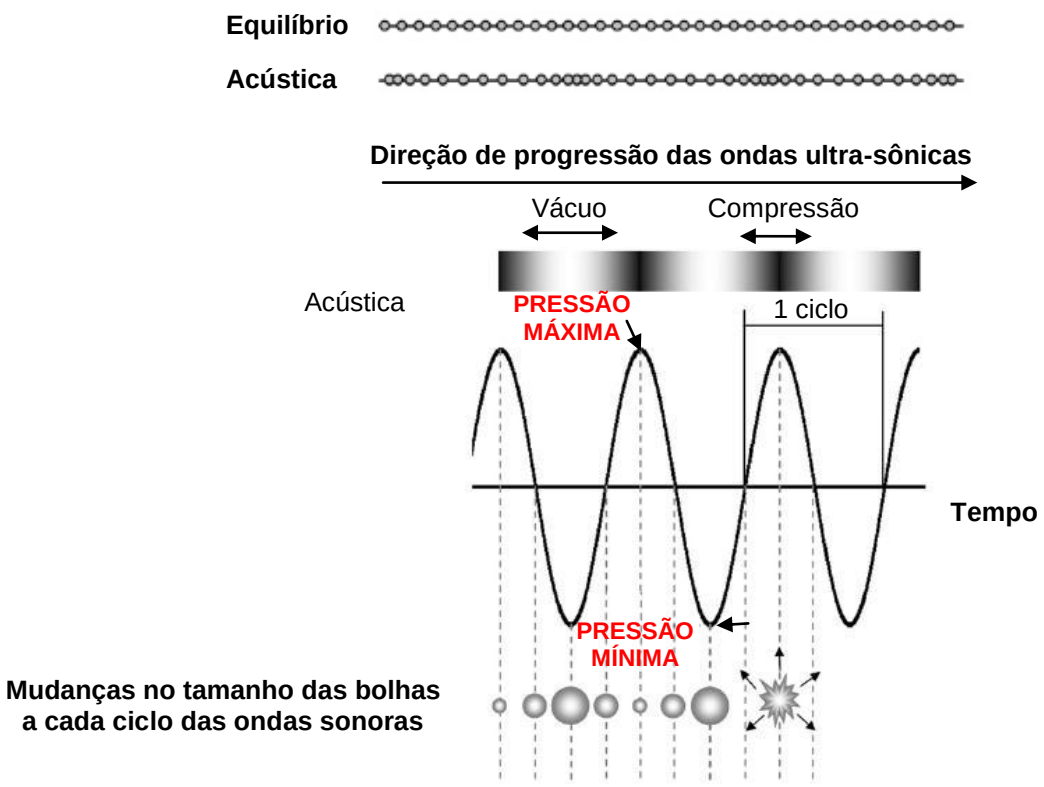


Figura 6: Cavitação ultra-sônica (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

No processamento de alimentos, é feita uma divisão entre o ultra-som de baixa intensidade (< 1 W/cm^2) utilizado como ferramenta analítica não destrutiva, e o ultra-som de alta intensidade (10-1000 W/cm^2), usado em frequências mais altas (até 2,5 MHz) para causar o rompimento físico de tecidos, criar emulsões, limpar equipamentos ou promover reações químicas como, por exemplo, a oxidação (FELLOWS, 2006).

O processo de sonicação isolado ou combinado com tratamento térmico (termosonicação), altas pressões (manosonicação) ou ambos (manotermosonicação) é reportado como um método efetivo na inativação de vários micro-organismos e enzimas de importância industrial (LEVANDOWSKY, 1981; PIYASENA; MOHAREB; MCKELLAR, 2003).

As forças de cisalhamento e as mudanças rápidas de pressão criadas pelas ondas de ultra-som são eficazes na destruição de células microbianas (FELLOWS, 2006). Em estudo realizado por Gómez-López et al. (2010), o tratamento ultra-sônico de suco de laranja foi capaz de reduzir a contagem de aeróbios mesófilos em 1.38

log UFC/mL e a contagem de bolores e leveduras em 0.56 log UFC/mL. O processamento ultra-sônico, em temperatura moderada, pode atingir um nível de redução de 5 ciclos logarítmicos em células de leveduras (ADEKUNTE et al., 2010)

Com relação à inativação enzimática, foi comprovado que o ultra-som aumenta a eficácia da inativação de enzimas. No estudo publicado por Ercan e Soysal (2011) foi observada uma redução de 100% da atividade peroxidásica de tomate utilizando potência ultra-sônica de 50% por 150 segundos a temperatura ambiente. Os autores afirmam, ainda, que a taxa de inativação enzimática aumenta proporcionalmente com a potência ultra-sônica.

Resultados conflitantes foram reportados por Manãs et al. (2006) que constataram que a sonicação a temperatura ambiente mostrou-se ineficaz na inativação de lisozima. No entanto, a inativação desejada foi obtida em temperaturas (60-80°C) e pressões (200 kPa) elevadas.

O'Donnell et al. (2010) ressaltam que a estabilidade das enzimas ao tratamento ultra-sônico varia de acordo com o tipo de enzima, das condições de tratamento, da composição do meio, do pH e do tipo de ligação que elas estabelecem com outras moléculas.

Diversos estudos têm revelado as aplicações das ondas ultra-sônicas no processamento de alimentos como na extração de componentes bioativos (RIERA et al., 2004; XIA; SHIN; WAN, 2006); na homogeneização de sucos (TIWARI et al., 2009); na desidratação de frutas (FERNANDES; GALÃO; RODRIGUES, 2008); em processos de esterificação (WEN et al., 2007) e emulsificação (CUCHEVAL; CHOW, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEKUNTE, A. O.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; SCANNELL, A. G. M.; O'DONNELL, C. P. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v.122, p.500-507, 2010.

2. AGUIAR, L. P. **β-caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento genético**. 2001. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

3. ALEGRO, J. H. A. **Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura**. 2003. 96p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

4. AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J. R.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, D. Probióticos. **Revista Española de Quimioterapia**, v.17, p.131-139, 2004.

5. ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro,** v.3, p.145-154, 2004.

6. ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.83-90, 2007.

7. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: jan. 2011.

8. ARS. Agricultural Research Service (NRRL) Culture Collection. Disponível em: <http://nrrl.ncaur.usda.gov/cgi-in/usda/prokaryote/report.html?nrrlcodes=B%2d442>. Acesso em: jan. 2010.

9. AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Editors). **Lactic acid bacteria**: microbiological and functional aspects. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-66.

10. BASTOS, M. S. R. **Processamento mínimo de melão *Cantaloupe* 'Hy-Mark': Qualidade e Segurança**. 2004. 178p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

11. BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA, O.; ORDUÑA, M.; MARTÍNEZ, F.; AGUILAR, B.; CORTÉS, A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: Effect on *Trichinella spiralis* infection. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.251-260, 1999.

12. BROMBERG, R. Probióticos: conceitos e aplicações. **CTC-TecnoCarnes**, v.13, p.6-7, 2003.

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

14. CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v.39, p.203-211, 2006.

15. CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.131-149, 1999.

16. CARDARELLI, H. R. **Desenvolvimento de queijo *petit suisse* simbiótico**. 2006. 149p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

17. CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews,** v.87, p.113-130, 1990.

18. CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.61-84, 2005.

19. COELHO, J. C. **Elaboração de bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei*.** 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

20. COGAN, T. M.; JORDAN, K. N. Symposium: The dairy *Leuconostoc.* Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2704-2707, 1994.

21. COLBÈRE-GARAPIN, F.; MARTIN-LATIL, S.; BLONDEL, B.; MOUSSON, L.; PELLETIER, I.; AUTRET, A.; FRANÇOIS, A.; NIBORSKI, V.; GROMPONE, G.; CATONNET, G.; VAN DE MOER, A. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. **Microbes and Infection**, v.9, p.1623-1631, 2007.

22. COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, v.591, p.276-289, 2005.

23. CORRÊA, S. B. M.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.1560-1568, 2008.

24. COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; PEREIRA, A. L. F.; RODRIGUES, S. *Lactobacillus casei* cultivation in pineapple juice: a new functional beverage. In: World Congress of Food Science and Technology, 15., 2010, Cape Town. **Proceedings…** Cape Town: IUFOST, 2010. CD-ROM.

25. CROSS, M. L.; MORTENSEN, R. R.; KUDSK, J.; GILL, H. S. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. **Medical Microbiology Immunology**, v.191, p.49-53, 2002.

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

27. CUCHEVAL, A.; CHOW, R. C. Y. A study on the emulsion of oil by power ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.916-92, 2008.

28. DE MORENO DE LEBLANC, A.; CHAVES, S.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; ANTÓINE, J.; PERDIGÓN, G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. **Immunobiology**, v.213, p.97-108, 2008.

29. DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.153-177, 1999.

30. DING, W. K.; SHAH, N. P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v.15, p.219-232, 2008.

31. DRISKO, J. A.; GILES, C. K.; BISCHOFF, B. J. Probiotics in health maintenance and disease prevention. **Alternative Medicine Review**, v.8, p.143-155, 2003.

32. DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

33. ELLI, M.; ZINK, R.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk. **International Dairy Journal**, v.9, p.507-513, 1999.

34. ERCAN, S. S.; SOYSAL, C. Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. **Ultrasonics Sonochemistry**. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.09.014., 2011.

35. ESCALANTE, L. A. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v.21, p.106-114, 2001.

36. FAMULARO, G.; DE SIMONE, C.; PANDEY, V.; SAHU, A. R.; MINISOLA, G. Probiotics lactobacilli: an innovative tool to correct the mal-absorption syndrome of vegetarians? **Medical Hypotheses**, v.65, p.1132-1135, 2005.

37. FAOSTAT. **Statistics sur la production agricole du *Cantaloupe* et autres melons**. Food and Agriculture Commodities Production. 2008.

38. FAO/AGNS. **Report on Functional Foods**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Food Quality and Standards Service Report. 2007.

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

40. FAVARO-TRINDADE, C. S.; BERNARDI, S.; BODINI, R. B.; BALIEIRO, J. C. C.; ALMEIDA, E. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. **Journal of Food Science**, v.71, p.S492-S495, 2006.

41. FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F.; MIZZI, L.; TORRIANI, S. Comparative sequence analysis of a recA gene fragment brings new evidence for a gange in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2113-2117, 2001.

42. FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: princípios e prática. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

43. FERNANDES, F. A. N.; GALLÃO, M. I.; RODRIGUES, S. Effect of osmotic dehydration and ultrasound pre-treatment on cell structure: Melon dehydration. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.604-610, 2008.

44. FERRERO M, CESENA C, MORELLI L, SCOLARI G, VESCOVO M. Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.140, p.215-219, 1996.

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

46. FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, Cap.4, p.150.

47. FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos: revisão. **Higiene Alimentar**, v.20, p.22-33, 2006.

48. GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **International Dairy Journal**, v.9, p.125-134, 1999.

49. GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

50. GIULIANO, G.; AL-BABILI, S.; VON LINTING, J. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. **Trends in Plant Science**. v.8, p.145-149, 2003.

51. GOMES JUNIOR, J.; MENEZES, J. B.; NUNES, G. H. S.; COSTA, F. B.; SOUZA, P.A. Qualidade pós-colheita do melão tipo *Cantaloupe*, colhido em dois estádios de maturação. **Horticultura Brasileira**, v.19, p.223-227, 2001.

52. GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, v.64, p.12-22, 1999.

53. GÓMEZ-LÓPEZ, V. M.; ORSOLANI, L.; MARTÍNEZ-YÉPEZ, A.; TAPIA, M. S. Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.808-813, 2010.

54. GONET-SURÓWKA, A. K.; STRUS, M.; HECZKO, P. B. P1250 influence of *Lactobacilli* probiotic strains on apoptosis of colon cancer cells lines. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.S343–S344, 2007.

55. GUCHTE, M. V.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 187-216, 2002.

56. GUERRERO, S., LOPEZ-MALO, A., ALZAMORA, S. M. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of temperature pH and amplitude. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.2, p.31-39, 2001.

57. HAYASHI, R.; BALNEY, C. (Eds.) Use of high pressure in bioscience and in biotechnology. In: **High Pressure Bioscience and Biotechnology**, Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1996, v.13, p.1-7.

58. HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.365S-373S, 2001[a].

59. HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.85-101, 2001[b].

60. HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, p.109-116, 2002.

61. HOMNAVA, A.; ROGERS, W.; EITENMILLER, R. R. Provitamin A activity of specialty fruit marketed in the United States. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.3, p.119-133, 1990.

62. HUNTER, G.; LUCAS, M.; WATSON, I.; PARTON, R. A radial mode ultrasonic horn for the inactivation of *Escherichia coli* K12. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.101-109, 2008.

63. IBDAH, M.; AZULAY, Y.; PORTNOY, V.; WASSERMAN, B.; BAR, E.; MEIR, A.; BURGER, Y.; HIRSCHBERG, J.; SCHAFFER, A. A.; KATZIR, N.; TADMOR, Y.; LEWINSOHN, E. Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. **Phytochemistry**, v.67, p.1579-1589, 2006.

64. IBGE – SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA (SIDRA). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=CA&z=t&o=11>. Acesso em: jun. 2010.

65. ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v.18, p.299-313, 2004.

66. JAGNOW, G.; DAWID, W. **Biotecnología: Introducción con experimentos modelos**. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, 1991.

67. JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p.524-534, 2007.

68. KANDLER, O.; WEISS, N. Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

69. KITAZAWA, H., TOBA; T., ITOH, T.; KUMANO, N.; ADACHI, S.; YAMAGUCHI, T. Antitumoral activity of slimeforming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. Cremoris isolated from Scandinavian ropy sour milk, ''viili''. **Animal Science Technology**, v.62, p.277-283, 1991.

70. KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.45-57, 1999.

71. KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.103, 1998.

72. KLEWICKA, E.; MOTYL, I.; LIBUDZISZ, Z. Fermentation of beet juice by bacteria of genus *Lactobacillus* sp. **European Food Research and Technology**, v.218, p.178-183, 2004.

73. KLEWICKA; E.; ZDUŤHCZYK, Z.; JUŚKIEWICZ, J. Effect of lactobacillus fermented beetroot juice on composition and activity of cecal microflora of rats. **European Food Research and Technology**, v.229, p.153-157, 2009.

74. KORAKLI, M.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Metabolism of bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.69, p.2073-2079, 2002.

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

76. LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.270-285, 2006.

77. LESBROS-PANTOFLICKOVA, D.; CORTHE´SY-THEULAZ, I.; BLUM, A. L. *Helicobacter pylori* and probiotics. **Journal of Nutrition**, v. 3, p.812-818, 2007.

78. LEVANDOWSKY, M. Microbial ecology of foods. Volume 1: Factors affecting life and death of microorganisms by The International Commission on Microbiogical Specifications for Foods. **Quartely Review of Biology**, v.56, p.204, 1981.

79. LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E.; BISCEGLI, C. I.; FILGUEIRAS, H. A. C. Qualidade pós-colheita de melão Gália submetido à modificação da atmosfera e 1-metilciclopropeno. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.793-798, 2005.

80. LÓPEZ, P.; BURGOS, J. Lipoxygenase inactivation by manothermosonication: effects of sonication physical parameters, pH, KCl. Sugars, glycerol and enzyme concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.620-625, 1995[a].

81. LÓPEZ, P.; BURGOS, J. Peroxidase stability and reactivation after heat treatment and manothermosonication. **Journal of Food Science**, v.60, p.451-455, 1995[b].

82. LÓPEZ, P.; SALA, F. J.; DE LA FUENTE, J. L.; CONDON, S.; RASO, J.; BURGOS, J. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polypohenol oxidase by manothermosonication. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, 252-256, 1994.

83. LOPEZ-MALO, A.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S. M. *Saccharomyces cerevisiae*, thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1215-1217, 1999.

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

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

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

87. MA, E. L.; CHOI, Y. J.; CHOI, Y.; POTHOULAKIS, C.; RHEE, S. H.; IM, E. The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is

mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. **International Journal of Cancer**, v.127, p.780-790, 2010.

88. MACHADO, M. R. G. **Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional**. 2007. 117p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

89. MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.213-222, 2003.

90. MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S.; CARVALHO, J. M.; FIGUEIREDO, R. W. **Processamento de frutas tropicais**: Nutrição, produtos e controle de qualidade. Fortaleza: Editora UFC, 2.ed., 277p., 2009.

91. MANÃS, P.; MUNÕZ, B.; SANZ, D.; CONDÓN, S. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1177-1182, 2006.

92. MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.S153-S157, 2002.

93. MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; AGUILAR-FIGUEROA, B.; HERNÁNDEZ-CRUZ, R.; MONROY-OSTRIA, A. *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* aumenta la protección no específica contra *Plasmodium chabaudi* AS en ratones. **Salud Pública de México**, v.48, p.498-503, 2006.

94. MASLOWSKI, K. M.; VIEIRA, A. T.; NG A.; KRANICH, J.; SIERRO, F.; YU, D.; SCHILTER, H. C.; ROLPH, M S.; MACKAY, F.; ARTIS, D.; XAVIER, R. J.; TEIXEIRA, M M.; MACKAY, C. R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v.461, p.1282-1286, 2009.

95. MATILLA-SANDHOLM, T.; BLUM, S.; COLLINS, J. K.; CRITTENDEN, R.; DE VOS, W.; DUNNE, C.; FONDEN, R.; GRENOV, G.; ISOLAURI, E.; KIELY, B.; MARTEAU, P.; MORELLI, L.; OUWEHAND, A.; RENIERO, R.; SAARELA, M.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; SCHIFFRIN, E.; SHANAHAN, F.; VAUGHAN, E.; VON WRIGHT, A. Probiotics: Towards demonstrating efficacy. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.393-399, 1999.

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

97. MENDES-FAIA, M. A. **Crescimento e metabolismo de bactérias láticas provenientes de vinhos da região de Trás-os-Montes**. **Sua intervenção na fermentação maloláctica**. 1987. 163p. Tese (PhD), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987.

98. MITSUOKA, T. **Intestinal bacteria and health: an introductory narrative.** Japão: Harcourt Brace Jovanovich Japan, 1978. 208p.

99. MOUSAVI, Z. E.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, doi: 10.1007/s11274-010-0436-1, 2010.

100. NAGAOKA, M.; HISHIMOTO, S.; WATANABE, T.; YOKOKURA, T.; MORI, Y. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell-wall polysaccharides. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.17, p.1012-1017, 1994.

101. NAKAJIMA, H.; SUZUKI, Y.; KAIZU, H.; HIROTA, T. Cholesterol-lowering activity of ropy fermented milk. **Journal of Food Science**, v.57, p.1327-1329, 1992.

102. NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; SADA, A.; ORLANDO, P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture***,* v.88, p. 2271-2276, 2008.

103. NEVES, L. S. **Fermentado probiótico de maçã**. 2005. 106p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2005.

104. ODA, M.; HASEGAWA, H.; KOMATSU, S.; KAMBE, M.; TSUCHIYA, F. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. **Agriculture Biology Chemistry** v.47, p.1623-1625, 1983.

105. O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.358-367, 2010.

106. ORRHAGE, K.; SILLERSTROM, E.; GUSTAFSSON, J. A.; NORD, C. E.; RAFTER, J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation Research**, v.311, p.239-248, 1994.

107. OTT, A., HUGI, A., BAUMGARTNER, M., CHAINTREAU, A. Sensory investigation of flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.441-450, 2000.

108. PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.162, p.166-180, 2009.

109. PENNA, F. J.; FILHO, L. A. P.; CALÇADO, A. C.; JÚNIOR, H. R.; NICOLI, J. R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, v.76, p.209-217, 2000.

110. PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, doi:10.1016/j.foodres.2010.11.035, 2011.

111. PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.207-216, 2003.

112. POMPEI, A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ZANONI, S.; RAIMONDI, S.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. Administration of folate-producing *Bifidobacteria* Enhances folate status in Wistar rats. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2742-2746, 2007.

113. PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de coco**. 2007. 183p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2007.

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

115. PRATT, H. K. Melons. In: HULME, A. C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic, 1971. v.2, p.207-232.

116. PRESSER, K.A., RATKOWSKY, D.A., ROSS, T. Modelling the growth rate of Escherichia coli as a function of pH and lactic acid concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2355-2360, 1997.

117. PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMANCALDENTEY, K. M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol**., v.13, p.3-11, 2002.

118. RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, v.55, p.207-216, 2007.

119. REID, G.; BRUCE, A. W.; TAYLOR, M. Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. **Microecology Therapy**, v.23, p.32-45, 1995.

120. RIERA, E.; GOLÁS, Y.; BLANCO, A.; GALLEGO, A.; BLASCO, M.; MULET, A. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.11, p.241-244, 2004.

121. ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. **Curcubits**. UK: Oxford, 1999. 226p.

122. ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.3-16, 2002.

123. RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILA´N, C. G.; SALMINEN, S. Effect of exopolysaccharide isolated from “Viili” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2355-2358, 2006.

124. SÁ, C. R. L.; SILVA, E. O.; TERAO, D.; OSTER, A. H**.** Efeito do KMnO4 e 1–MCP com atmosfera modificada na conservação pós-colheita de melão *Cantaloupe*. **Revista Ciência Agronômica**, v.39, p.60-69, 2008.

125. SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.1-16, 2006.

126. SAITO, H.; WATANABE, T.; TADO, O. Protective effects of lactobacilli on experimental *Escherichia coli* infection. **Medicine and Biology**, v.101, p.61-64, 1980.

127. SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**. 3 ed., Marcel Dekker, 2004. 617p.

128. SANDERS, M. E.; HUIS IN'T VELD, J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p.293-315, 1999.

129. SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic and Applied Microbiology**, v.18, p.461-467, 1995.

130. SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**. Canoas: Editora da Ulbra. 1998. 248p. cap.10. p.105-117.

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

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

133. SHIN, H. S.; LEE, J. H.; PESTKA, J. J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v.65, p.884-887, 2000.

134. SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.411-417, 1999.

135. SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v.14, p.68-69, 2000.

136. SILVEIRA, M. S.; FONTES, C. P. M. L.; GUILHERME, A. A.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cashew apple juice as substrate for lactic acid production. **Food and Bioprocess Technology**, doi: 10.1007/s11947-010-0382-9, 2010.

137. SMULDERS, F. J. M.; BARENDSEN, P; VAN LOGTESTIJN, J. G.; MOSSEL, D. A. A.; VAN DER MAREL, G. M. Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. **Journal of Food Technology**, v.21, p.419-436, 1986.

138. SONGISEPP, E.; KULLISAAR, T.; HÜTT, P.; ELIAS, P.; BRILENE, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. A New probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2017-2023, 2003.

139. SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.323-331, 2010.

140. STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E. R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.27-58.

141. STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**. v.16, p.198-203, 2005.

142. STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.

143. SUSLICK, K. S. The chemical effects of ultra-sound. **Scientific American***,* v.2*,* p.80-86*,* 1989.

144. TANNOCK, G. W. **Normal microflora**. London: Chapman & Hall, 1995, 111p.

145. TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.166-171, 2009.

146. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 11, p. 309.

147. TSENG, C. H.; MONTVILLE, T. J. Metabolic regulation and distribution in *Lactobacillus*: causes and consequences. **Biotechnology Progress**, v.9, p.113-121, 1993.

148. TWETMAN, S.; STECKSÉN-BLICKS, C. Probiotics and oral health effects in children. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.18, p.3-10, 2008.

149. USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: < http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl>. Acesso em: set. 2010.

150. VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic Applied Microbiology**, v.28, p.430-441, 2005.

151. VERCET, A.; LOPEZ, P.; BURGOS, J. Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. **Dairy Science**, v.80, p.29-36, 1997.

152. VILLAMIEL, M.; DE JONG, P. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.472-478, 2000.

153. XIA, T.; SHI, S.; WAN, X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.557-560, 2006.

154. WANG, Y. C.; ROCH-CHUI YU, CHENG-CHUN CHOU. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.209-217, 2004.

155. WEN, B.; ELI, W.; XUE, Q.; DONG, X.; LIU, W. Ultrasound accelerated esterification of palmitic acid with vitamin C. **Ultrasononic Sonochemistry**, v.14, p.213-218, 2007.

156. WINTERHALTER, P.; SCHREIER, P. The generation of norisopernoid volatiles in starfruit (*Averrhoa carambola* L.): a review. **Food Review International** v.11, p.237-254, 1995.

157. WINTERHALTER, P., ROUSEFF, R.L. Carotenoid derived aroma compounds: an introduction. In: WINTERHALTER, P., ROUSEFF, R.L. (Eds.), **Carotenoid-Derived Aroma Compound**s, ACS Symposium Series: Washington DC, 2002. p.1-17.

158. WISSELINK, H. W.; WEUSTHUIS, R. A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v.12, p.151-161, 2002.

159. WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.S451–S455, 2001.

160. WOOD, B. J .B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria vol. 2**, Blackie Academic & Professional: Glasgow, 1995.

161. YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v.38, p.73-75, 2005.

162. YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v.42, p.315-318, 2004.

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

CAPÍTULO 2

Otimização do processo fermentativo de suco de melão por Lactobacillus casei NRRL B-442

Otimização do processo fermentativo de suco de melão por *Lactobacillus casei* NRRL B-442

Thatyane V. Fonteles[1]; Mayra G. M. Costa[1]; Ana L. T. de Jesus[1]; Ana L. F. Pereira[1]; Sueli Rodrigues[1]

[1]Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo determinar as condições ótimas de pH e temperatura de fermentação para a elaboração de um novo alimento probiótico fermentado à base de suco de melão. Para isso, um planejamento fatorial foi conduzido, variando-se o pH inicial na faixa de 4,29 a 7,11 e temperatura na faixa de 10,44 a 41,56°C utilizando-se a metodologia de análise de superfície de resposta para a análise dos resultados. As variáveis dependentes analisadas foram viabilidade e o crescimento celular. Verificou-se que o pH inicial e a temperatura de fermentação influenciaram o crescimento de *L. casei* no suco de melão. No entanto, somente o efeito da temperatura sobre a viabilidade do micro-organismo foi significativo. A melhor condição encontrada que garantisse um bom crescimento do micro-organismo, além de assegurar a viabilidade celular necessária para que o produto seja considerado probiótico foi a temperatura de 31°C com o pH inicial do suco de 6,1.

Palavras-chave: Suco Probiótico. *Lactobacillus casei* B-442. *Cucumis melo* L.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the optimum conditions of fermentation pH and temperature for the development of a new probiotic fermented food with melon juice. A factorial experimental design was carried out with the initial pH ranging from 4.29 to 7.11 and temperature ranging from 10.44 to 41.56 °C using the response surface methodology for results analysis. The dependent variables analyzed were viability and cell growth. The initial pH and the fermentation temperature influenced the growth of L. casei in melon juice. However, only the effect of temperature on the microbial viability was significant. The best condition found to guarantee a good growth of the microorganism and ensure the cellular viability necessary for the product to be considered probiotic was 31°C with initial pH of 6.1.

Keywords: Probiotic juice. *Lactobacillus casei* B-442. *Cucumis melo* L.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes fatores afetam o crescimento das bactérias ácido-láticas (BAL) em meios de fermentação. Além dos requerimentos nutricionais, a temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento. Existe uma temperatura ótima em que a taxa de crescimento é máxima e esta depende das características intrínsecas de cada micro-organismo bem como das condições do meio de cultura. Quando a temperatura fica acima ou abaixo do requerido para um ótimo crescimento, a atividade microbiana é substancialmente reduzida e os organismos podem morrer (PANESAR et al., 2007).

De Figueroa, Oliver e Benito de Cárdenas (2001) avaliaram a produção de ácido lático por *L. rhamnosus* e concluíram que a linhagem produziu mais ácido lático a 45ºC e menos a 37ºC enquanto a produção de acetoína e diacetil foi maior a 37ºC do que a 45ºC.

Vários estudos têm mostrado a influência do pH no crescimento e sobrevivência de bactérias láticas. Donkor et al. (2006) avaliaram o efeito da acidificação de iogurte durante sua estocagem e concluíram que o meio ácido afetou a viabilidade de *Bifidobacterium lactis* e *L. paracasei*. Shah (2000) aponta o declínio do pH do meio decorrente da produção de ácidos orgânicos como o principal fator para a perda de viabilidade de micro-organismos probióticos.

Kandler e Weiss (1986) reportaram que espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus,* crescem em temperaturas que variam de 2 a 53 °C, com valores ótimos, geralmente de 30 a 40 °C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2 podendo se desenvolver em pH 5,0 ou menor. Porém, em virtude das características individuais das bactérias quanto à taxa de crescimento, metabolismo, e atividade proteolítica, o sucesso da adição de probióticos em alimentos dependerá da espécie, linhagem, possíveis interações com outras bactérias, pH do produto, presença de oxigênio e temperatura de fermentação e estocagem (FERREIRA et al., 2005; GARRO et al., 1999; VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000; ZACARCHENCO, 2004). Desta forma, este trabalho teve como objetivo otimizar o pH e temperatura de fermentação para o desenvolvimento e manutenção da viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do micro-organismo

A linhagem de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 utilizada neste estudo para elaboração do suco de melão probiótico foi obtida junto ao banco de micro-organismos do Departamento Estadual de Agricultura dos EUA (*United States Departament of Agricultural*, Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection). O micro-organismo foi mantido congelado a -20°C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Himedia®) adicionado de glicerol 50% (v/v).

2.2 Ativação de *Lactobacillus casei* B-442

A linhagem estudada foi ativada inoculando-se 8 mL da cultura estoque (congelada a –20°C) em 100 mL de caldo MRS (Himedia®) adicionado de 10 mL de tampão fosfato de potássio dibásico 200 mM pH 6,5. A ativação foi conduzida em estufa incubadora B.O.D. estática Marconi®, modelo MA415 a 37°C por tempo suficiente (± 12 horas) para atingir uma concentração de células da ordem de 10^9 UFC/mL, equivalente a 0,600 de absorbância a 590nm na escala de McFarland (MARIANO, 2000).

2.3 Preparo do suco de melão

O suco de melão da variedade *Cantaloupe* (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud.) foi formulado a partir da polpa da fruta congelada (Tropicássia®) sem a adição de conservantes obtida no comércio local, em uma proporção de 1:1 de água e polpa (± 3°Brix) (BRASIL, 2003).

2.4 Caracterização do suco de melão

O suco foi inicialmente caracterizado quanto ao seu pH, teor de açúcares e proteínas. A metodologia das análises está descrita nos itens a seguir.

2.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro Marconi®, modelo PA200, calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme metodologia da AOAC (2010).

2.4.2 Determinação de açúcares

Os açúcares do suco *in natura* foram identificados e quantificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) modelo *Prostar* 210, utilizando um detector de índice de refração (IR) *Prostar* 355, ambos da marca Varian®. As condições de operação estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de operação do cromatógrafo líquido de alta eficiência

	Açúcares
Coluna	BIO-RAD HPX-87C
Dimensões da coluna	300mm x 7,8 mm
Fase móvel	Água *Milli*Q
Temperatura	85°C
Vazão da fase móvel	0,6 mL/min
Pressão da bomba	14 bar
Volume injetado	20µL
Detector	Índice de refração (35°C)

As amostras analisadas foram centrifugadas (9.676 x *g*/ 10min, a 25ºC), diluídas em água *Milli*-Q (Millipore) e submetidas à extração em fase sólida, usando um cartucho C_{18} (Bond Elut C_{18}), a fim de remover substâncias coloridas, que podem interferir na determinação do analito de interesse. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (Millipore) com poros de 0,45 µm.

Tabela 2: Constituintes e respectivos tempos de retenção do padrão utilizado nas análises cromatográficas

Componentes	Tempo de retenção (min)
Sacarose	9
Glucose	10
Frutose	13

Utilizou-se como padrão uma mistura de soluções puras de concentrações conhecidas (Sigma®) (faixa de 0,4 a 8 g/L) dos constituintes apresentados na Tabela 2, que mostra também os tempos de retenção de cada componente.

2.4.3 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada segundo Bradford (1976), usando albumina bovina sérica (BSA) como padrão protéico. A determinação foi realizada através da adição de 750µL do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 a 50 µL da amostra e 700µL de água destilada e 5 minutos após a adição do reagente realizou-se a leitura em espectrofotômetro, a 465nm e 595nm utilizando água como branco. Os resultados foram expressos em grama por litro de suco.

2.5 Otimização do processo de produção do suco probiótico

Com o objetivo de otimizar o pH e a temperatura de fermentação e estudar seus efeitos no processo fermentativo para elaboração da bebida probiótica à base de suco de melão, foi conduzido um planejamento experimental central compósito rotacionado (2^2) com três pontos centrais, variando-se o pH inicial do suco na faixa de 4,29 a 7,11 e temperatura de incubação na faixa de 10,41 a 41,56^{o}C (Tabelas 3 e 4) utilizando-se a metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002) para a análise dos resultados. Os valores de pH e temperatura do planejamento foram fundamentados na faixa de crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* que segundo Kandler e Weiss (1986) situa-se

entre 2 e 53°C e em pH ácido a neutro. O ajuste do pH inicial dos sucos foi realizado através da adição de ácido cítrico 1M ou hidróxido de sódio 3M de acordo com o planejamento experimental.

Tabela 3: Fatores independentes e níveis utilizados para a otimização do pH e temperatura de fermentação do suco de melão por *L. casei* B-442

Fator Independente	Nível codificado				
	- α	**-1**	**0**	**+1**	**+ α**
pH	4,29	4,70	5,70	6,70	7,11
Temperatura (°C)	10,44	15	26	37	41,56

Tabela 4: Planejamento experimental de otimização do processo de produção da bebida fermentada probiótica à base de suco de melão

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

A linhagem ativada em caldo MRS foi inoculada assepticamente, em 100 mL do suco em uma proporção de 1% (v/v). As variáveis analisadas foram o incremento em biomassa e a contagem de células viáveis após 24 horas de incubação do meio à base de suco de melão nas condições estabelecidas pelo planejamento

experimental. Os resultados obtidos foram analisados, utilizando o software Statistica v.7.0.

2.5.1 Determinação do crescimento microbiano

O crescimento do micro-organismo expresso em biomassa seca foi monitorado através da determinação da densidade ótica a 590 nm. A biomassa celular seca foi calculada através de uma curva de calibração da densidade ótica de *L. casei* B-442 em função da massa seca (g/L) (Equação 3) elaborada de acordo com Rodrigues, Lona e Franco (2003).

$$m(g/L) = \frac{ABS\ (600nm - 0{,}00818)}{3{,}395} \quad \textbf{(3)}$$

Onde:

m(g/L) = biomassa em base seca em gramas por litro

Nesta análise, diluiu-se uma alíquota do suco recém inoculado e fermentado em água destilada (1:10) e realizou-se a leitura da absorbância contra um branco com água. As leituras de DO_{590} foram realizadas em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP200UV. A diferença entre as absorbâncias inicial e final correspondeu ao crescimento do micro-organismo durante a fermentação.

2.5.2 Contagem de células viáveis de *Lactobacillus casei* no suco fermentado

Para a análise da viabilidade de *L. casei* no suco fermentado, as amostras foram diluídas seriadamente em água peptonada (Himedia) estéril e semeadas pelo método '*spread plate*' em placas de ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C durante 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias típicas de *L. casei*. Os resultados foram expressos em logaritmo de unidades formadoras de colônias (log UFC/ mL).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição do suco de melão

Neste trabalho, o suco de melão da variedade *Cantaloupe* foi avaliado como possível substrato para o desenvolvimento do micro-organismo probiótico *L. casei* B-442. A Tabela 5 apresenta os resultados referentes às determinações de composição de açúcares redutores e não redutores e proteínas do suco de melão.

Tabela 5: Composição de açúcares e proteínas do suco de melão [(1)]

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	5,00 ± 0,05
Glucose	5,75 ± 0,01
Frutose	6,40 ± 0,03
Proteínas	$5,3 \times 10^{-3} \pm 0,03$

[(1)] Valores são: média ± desvio padrão (n=3).

A caracterização preliminar do substrato revelou que o suco de melão é rico em açúcares fermentescíveis mostrando que este pode ser empregado como substrato para o crescimento de *Lactobacillus casei* B-442.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam requerimentos nutricionais complexos exigindo para um crescimento pleno, aminoácidos livres, peptídeos derivados de ácidos nucléicos, vitaminas, carboidratos fermentescíveis dentre outros nutrientes (KANDLER; WEISS, 1986).

O suco apresentou uma baixa concentração de proteínas. No entanto, o melão é um fruto rico em aminoácidos livres. Lamikanra et al. (2000) quantificaram e identificaram 18 aminoácidos em melão *Cantaloupe* sendo que os aminoácidos dominantes foram: ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina e alanina. Esta característica representa uma vantagem do uso do suco de melão para o desenvolvimento de *L. casei* em relação ao leite. Segundo Elli et al. (1999), algumas bactérias do grupo *Lactobacillus* são incapazes de se desenvolver no leite sem suplementação, uma vez que este é um meio que possui poucos aminoácidos livres em sua composição.

A análise de pH do suco de melão, apresentou um valor médio de 6,16 ± 0,01, sendo este resultado semelhante ao citado por Bastos (2004), que comenta que melões da variedade *Cantaloupe* possuem pH na faixa de 6,0 a 6,5. Em geral, o melão apresenta quantidades substanciais dos ácidos cítrico e málico, mas com predominância do primeiro (PRATT, 1971).

3.2 Otimização do processo de elaboração do suco de melão probiótico

Para avaliar o crescimento de bactérias ácido-láticas, torna-se necessário conhecer as concentrações dos substratos do meio de crescimento, as condições de temperatura e o valor de pH, pois são os fatores de maior influência no seu desenvolvimento (OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

A Tabela 6 apresenta as condições experimentais e os resultados obtidos onde foram avaliados o crescimento e a viabilidade de *L. casei* após 24 horas de fermentação do suco de melão.

Tabela 6: Planejamento experimental e resultados obtidos para a otimização do crescimento e manutenção da viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão após 24 horas de fermentação [(2)]

Ensaio	pH inicial	T(° C) de fermentação	Crescimento (g/L)	Viabilidade (log UFC/mL)
1	4,70	15,00	0,15 ± 0,09	7,87 ± 0,00
2	4,70	37,00	0,53 ± 0,14	8,45 ± 0,21
3	6,70	15,00	0,23 ± 0,02	7,43 ± 0,04
4	6,70	37,00	0,79 ± 0,00	8,66 ± 0,10
5	4,29	26,00	0,26 ± 0,05	7,48 ± 0,21
6	7,11	26,00	0,51 ± 0,06	8,61 ± 0,02
7	5,70	10,44	0,08 ± 0,06	6,72 ± 0,03
8	5,70	41,56	0,53 ± 0,04	8,22 ± 0,21
9	5,70	26,00	0,60 ± 0,01	8,83 ± 0,02
10	5,70	26,00	0,63 ± 0,04	8,87 ± 0,00
11	5,70	26,00	0,67 ± 0,03	8,83 ± 0,01

[(2)] Valores são média ± desvio padrão (n=3).

Os resultados mostraram que o micro-organismo probiótico em estudo foi capaz de fermentar o suco de melão, utilizando os açúcares presentes naturalmente no suco, sem a necessidade de adição de sacarose ou de outros nutrientes.

Apenas no ensaio 7 (T=10,44ºC; pH=5,7) observou-se pouco crescimento (0,08 ± 0,01 g/L) e perda de viabilidade (6,72 ± 0,03 log UFC/mL), considerando que a concentração inicial de células no tempo zero foi de 7 log UFC/mL. Esse resultado confirma a característica mesofílica desta linhagem. Apesar da redução observada, em todos os ensaios realizados a concentração de células viáveis se apresentou mais elevada que a exigida na legislação brasileira para produtos probióticos (8-9 log UFC/porção do produto) (ANVISA, 2008).

Observou-se que no intervalo de confiança de 95%, o pH e a temperatura apresentaram efeito significativo sobre o crescimento de *L. casei* B-442, embora o efeito da temperatura (linear e quadrática) tenha sido mais pronunciado (Figura 1). Com relação à viabilidade, após o período de fermentação (24h), apenas a temperatura apresentou influência significativa. Analisando a Figura 2, é possível observar que temperaturas mais elevadas afetam negativamente a manutenção da viabilidade de *L. casei* (efeito quadrático da temperatura).

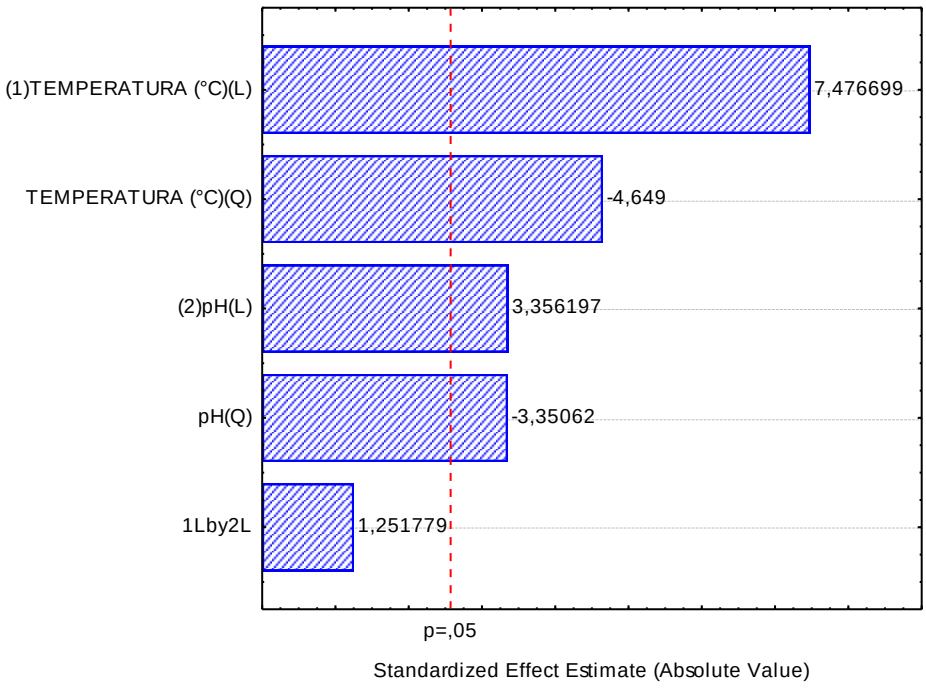


Figura 1: Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis independentes no crescimento de *L. casei* em suco de melão fermentado.

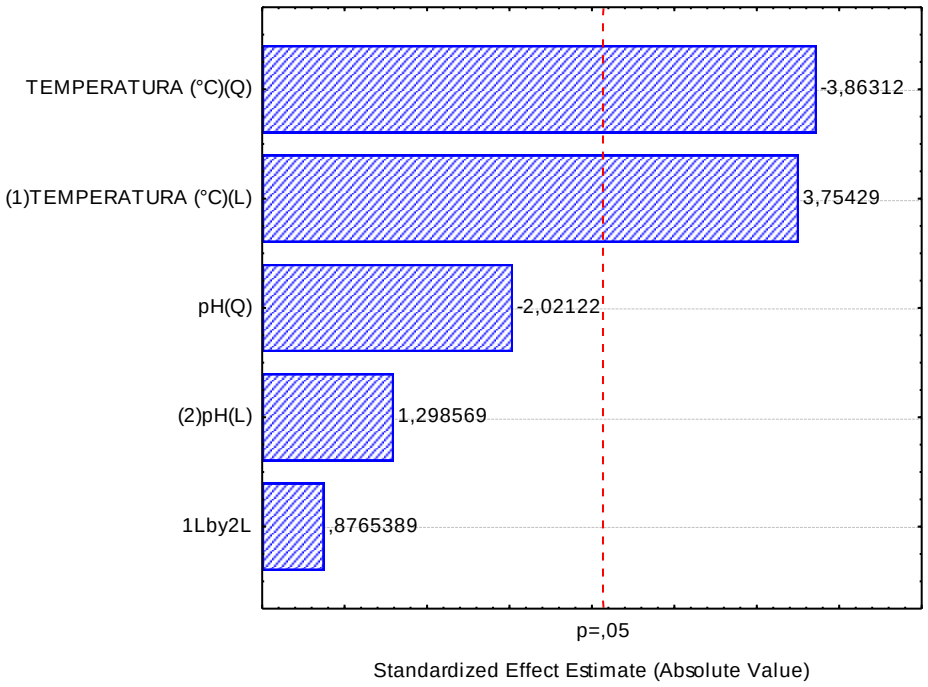


Figura 2: Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis independentes na viabilidade de *L. casei* em suco de melão fermentado.

De modo semelhante, Kempka et al. (2008) observaram que dentre os parâmetros pH, temperatura e agitação, os dois últimos foram os fatores que mais afetaram o crescimento celular de culturas láticas no desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada sabor pêssego, sendo que a temperatura apresentou efeito positivo e a agitação um efeito negativo no crescimento celular, este último resultado era esperado, já que as culturas láticas são anaeróbicas facultativas ou anaeróbias.

Os efeitos da variável pH (linear e quadrática), bem como a sua interação com a variável temperatura (1L by 2L) na contagem de células viáveis após a fermentação não apresentaram significância estatística no intervalo de confiança de 95%. Este resultado pode ser justificado pela maior resistência às condições ácidas das bactérias do gênero *Lactobacillus*. Dentre os micro-organismos pertencentes ao grupo das bactérias ácido-láticas, as bactérias do gênero *Lactobacillus* são as que toleram um pH citoplasmático mais ácido (pH interno: 4,4; pH externo: 3,5). No entanto, quando o pH citoplasmático decresce abaixo de um determinado limiar, as funções celulares são inibidas (KASHKET, 1987).

Os modelos de regressão obtidos para o crescimento e contagem do número de células viáveis de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado estão expressos pelas equações 1 e 2, respectivamente.

$$\textbf{Crescimento}_{(g/L)} = -3{,}90 + 0{,}05x - 0{,}001x^2 + 1{,}16y - 0{,}10y^2 + 0{,}004xy + 0 \quad \textbf{(1)}$$

$$\textbf{Viabilidade}_{(\log UFC/mL)} = -4{,}69 + 0{,}21x - 0{,}004x^2 + 3{,}38y - 0{,}31y^2 + 0{,}01xy + 0 \quad \textbf{(2)}$$

Onde:
x = temperatura de fermentação;
y= pH inicial do suco.

De acordo com a análise de variância (Tabelas 7 e 8), os valores de F calculado para os modelos de crescimento e viabilidade de *L. casei* B-442 foram 18,93 e 6,47, respectivamente, ou seja, maiores que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança. Assim os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F.

Tabela 7: Análise de variância para o modelo de crescimento de *L. casei* em suco de melão fermentado

Fonte de variação	**Soma quadrática**	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**Valor de *F***
Regressão	0,514	05	0,102	18,93
Residual	0,027	05	0,005	
Total	0,541	10		
Coeficiente de determinação	0,949			
F tabelado (95%)				$F_{5,5}$ = 5,05

Tabela 8: Análise de variância para o modelo de viabilidade de *L. casei* em suco de melão fermentado

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	Valor de *F*
Regressão	4,403	05	0,880	6,47
Residual	0,680	05	0,136	
Total	5,083	10		
Coeficiente de determinação	0,860			
F tabelado (95%)				$F_{5,5}$ = 5,05

Como a superfície de resposta apresenta uma região bem definida para a máxima crescimento e viabilidade de *L. casei* (Figuras 3 e 4) as condições ótimas foram encontradas através da determinação do ponto crítico (derivada igual a zero) das equações 1 e 2. Dentro das condições experimentais estudadas, o crescimento máximo do micro-organismo foi atingido em pH 6,3 e temperatura de 34°C. Porém, a maior contagem de células viáveis foi em pH 6,1 e temperatura de 31°C.

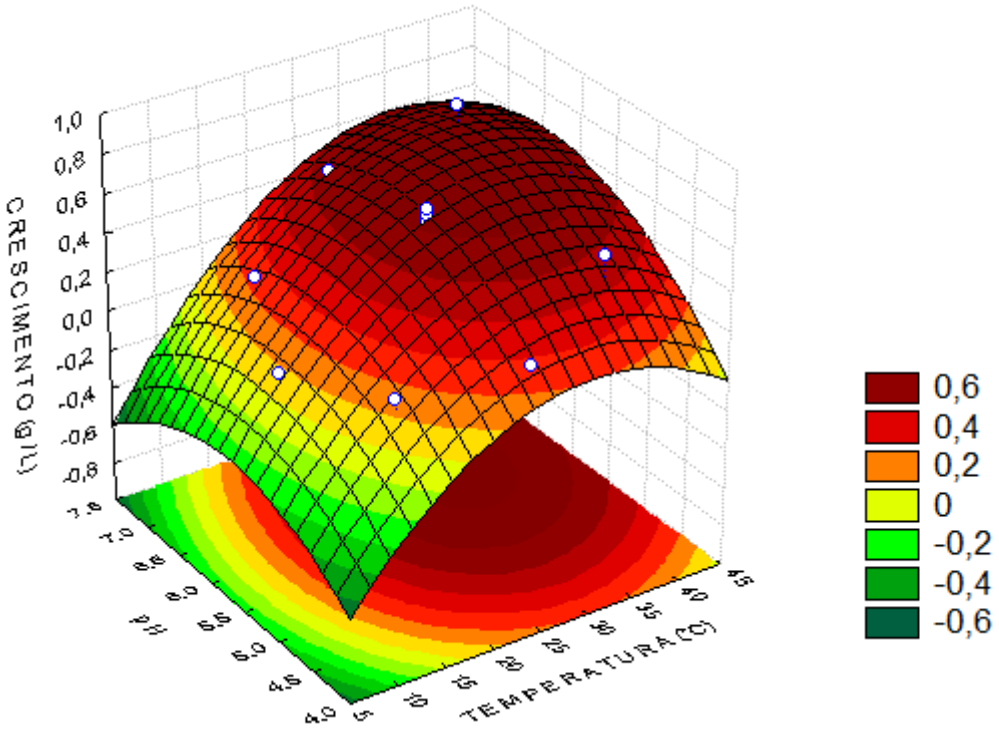


Figura 3: Gráfico de superfície de resposta para a otimização do crescimento de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado.

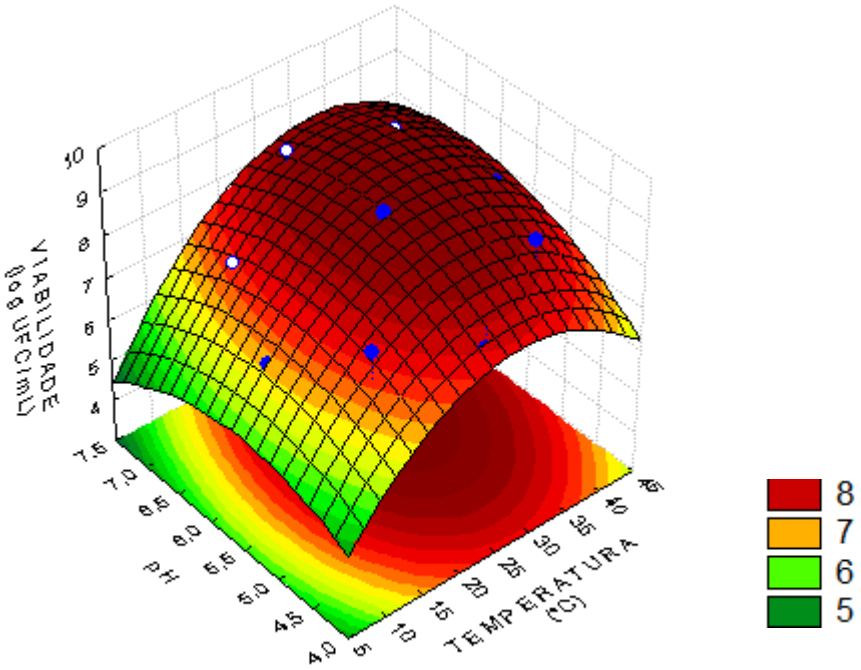


Figura 4: Gráfico de superfície de resposta para a otimização da viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado.

É importante enfatizar que o objetivo deste estudo foi não somente a otimização do crescimento do micro-organismo como também a manutenção de sua viabilidade uma vez que essa é uma condição fundamental para que sejam observados os efeitos benéficos da ingestão de probióticos. Logo, as condições otimizadas escolhidas foram as que mais favoreceram a manutenção da viabilidade celular de *L. casei* B-442 (pH 6,1 e temperatura de 31°C). Nestas condições o crescimento e a viabilidade celular máximos, calculados através do modelo matemático obtido, foram de 0,72 g/L e 8,98 log UFC/mL, respectivamente.

Costa et al. (2010) e Pereira, Maciel e Rodrigues (2011) estudaram a elaboração de suco de abacaxi e caju fermentados, respectivamente, com a mesma linhagem utilizada neste trabalho. Esses autores concluíram que o pH inicial e a temperatura de fermentação nas quais o micro-organismo apresentou máxima viabilidade foram pH 5,8 e 31°C para o suco de abacaxi e pH 6,4 a 30°C para o suco de caju, valores próximos aos encontrados neste estudo.

4. CONCLUSÕES

- O micro-organismo probiótico estudado foi capaz de utilizar o suco de melão sem nenhuma suplementação, para a síntese celular e produção de ácidos apresentando contagem de células viáveis compatível com o estabelecido pela legislação brasileira (> 8 log UFC/porção);
- As condições ótimas para o crescimento de *L. casei* no suco e manutenção de sua viabilidade foram a temperatura de fermentação de 31°C e pH inicial de 6,1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: jan. 2011.

2. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry: Vitamins and other nutrients. Washington: AOAC, p.4, 2010.

3. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de Experimentos**, São Paulo: Editora da UNICAMP, 2002.

4. BASTOS, M. S. R. **Processamento mínimo de melão *Cantaloupe* 'Hy-Mark': Qualidade e Segurança**. 2004. 178p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

5. BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantitie of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Chemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 12, de 4 de setembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade Gerais para suco tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos sucos tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá Pêssego e Pitanga. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 set. 2003. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: maio. 2009.

7. COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; PEREIRA, A. L. F.; RODRIGUES, S. *Lactobacillus casei* cultivation in pineapple juice: a new functional beverage. In:

World Congress of Food Science and Technology, 15., 2010, Cape Town. **Proceedings…** Cape Town: IUFOST, 2010. CD-ROM.

8. DE FIGUEROA, R. M.; OLIVER, G.; BENITO DE CÁRDENAS, I. L. Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Microbiological Research, v.155, p.257-262, 2001.

9. DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.16, p.1181-1189, 2006.

10. ELLI, M.; ZINK, R.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk**. International Dairy Journal**, v.9, p.507-513, 1999.

11. FERREIRA, V.; SOARES, V.; SANTOS, C.; SILVA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. **Biotechnology Letters**, v.27, p.249-252, 2005.

12. GARRO, M. S.; DE VALDEZ, G. F.; OLIVER, G.; DE GIORI, G. S. Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. **Journal of Food Protection**, v.62**,** p.808-810, 1999.

13. GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, v.64, p.12-22, 1999.

14. GUYOT, J. P.; CALDERON, M.; MORLON-GUYOT, J. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.176-182, 2000.

15. KANDLER, O.; WEISS, N. 1986. Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. and HOLT, J. G. (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.

16. KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v.46, p.233-244, 1987.

17. KEMPKA, A. P.; KRÜGER, R. L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.170-177, 2008.

18. LAMIKANRA, O.; CHEN, J. C.; BANKS, D.; HUNTER, P. A. Biochemical and Microbial Changes during the Storage of Minimally Processed *Cantaloupe*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.5955-5961, 2000.

19. LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.115-131, 2003.

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

21. OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Effect of total solids and sucrose contents on acidity, firmness and viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v.23 (supl.), p.172-176, 2003.

22. PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, p.1-14, 2007.

23. PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, doi:10.1016/j.foodres.2010.11.035, 2011.

24. PRATT, H. K. Melons. In: HULME, A. C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic, 1971. v. 2, p.207-232.

25. RHEE, S. K.; PACK, M. Y. Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 144, p. 217- 221,1980.

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

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

28. SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

29. TSENG, C. P.; MONTVILLE, T. J. Enzyme activities affecting end product distribution by *Lactobacillus plantarum* in response to changes in pH and O2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2761-2763, 1990.

30. VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage **Food Research International**, v.33, p.97-102, 2000.

31. ZACARCHENCO, P. B. **Leites fermentados por *Str. thermophilus* adicionados de *Lb. acidophilus* e *Bif. longum*: Isolamento diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e efeitos nas características sensoriais dos leites fermentados naturais ou modificados**. 2004. 181p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CAPÍTULO 3

Influência do processamento ultra-sônico na qualidade de suco de melão

Influência do processamento ultra-sônico na qualidade de suco de melão

Thatyane V. Fonteles[1]; Mayra G. M. Costa[1]; Ana L. T. de Jesus[1]; Maria R. A. Miranda[2], Luciana de S. Oliveira[2]; Fabiano A. N. Fernandes[3]; Sueli Rodrigues[1]

[1] Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.
[2] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.
[3] Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO

Neste trabalho foram investigados os efeitos do tratamento ultra-sônico em parâmetros de qualidade do suco de melão *Cantaloupe*. Um planejamento fatorial composto central foi desenvolvido tendo como variáveis dependentes as atividades residuais das enzimas polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) e peroxidase do ascorbato (APx), cor, redução de compostos fenólicos e homogeneização do suco em função do tempo de tratamento e intensidade ultra-sônica. O processamento ultra-sônico utilizando 372,93 W/cm^2 de intensidade durante 10 minutos foi capaz de reduzir significativamente a atividade das enzimas POD e PPO com valores de atividade residual de 23,29% ± 3,40 e 70,48% ± 1,46, respectivamente. Para a enzima APx, o tratamento nestas condições foi capaz de reduzir 100% da atividade desta enzima. Observou-se que esse binômio intensidade-tempo (372,93 W/cm^2/10min) foi o tratamento que teve menor influência nos parâmetros de cor do suco de melão além de manter o suco homogêneo durante 6 semanas de estocagem refrigerada. Com relação aos compostos fenólicos, houve redução significativa desse parâmetro atingindo cerca de 30% de redução.

Palavras-chave: Tecnologia não-térmica. ultra-som. enzimas deteriorantes.

ABSTRACT

The effects of ultrasound treatment on quality parameters and on peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and ascorbate peroxidase (APx) activity changes of Cantaloupe juice, were investigated. A factorial central composite design was carried out taking as dependent variables the residual activity of the enzyme POD, PPO and APx, color, degradation of phenolic compounds and homogenization of the juice as a function of treatment time and ultrasonic intensity. The processing using ultrasonic intensity of 372.93 W/cm^2 for 10 minutes was able to achieve a significant reduction on POD and PPO activity with residual activities of 23.29% ± 3.40 and 70.48% ± 1.46, respectively. For the enzyme APx, US treatment under these conditions was able to reduce 100% of the enzyme activity. It was noted that the intensity-time pattern 372,93 W/cm^2/10min was the treatment that had less influence on color parameters of melon juice in addition to keeping the juice homogeneous during six weeks of cold storage. Ultra-sound process caused a significant reduction of phenolic compounds reaching about 30% reduction.

Keywords: Non-thermal technology. ultrasound. spoilage enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por produtos de qualidade nutricional e sensorial, com características mais próximas às do produto *in natura*, tem levado à busca e ao aperfeiçoamento de processos capazes de preservar os alimentos contra agentes deteriorantes, sem acarretar os efeitos adversos comuns aos processamentos convencionais, principalmente os que envolvem tratamento térmico. Novas tecnologias de processamento não térmico têm recebido avanços significativos para uso em escala comercial, tais como: campos elétricos pulsantes, radiação ionizante, alta pressão hidrostática e ultra-som (FONTES; RAMOS, 2008).

O processamento ultra-sônico é uma tecnologia não térmica que tem se mostrado eficaz na inativação de micro-organismos (GUERRERO; LOPEZ-MALO; ALZAMORA, 2001; HUNTER et al., 2008; MANAS; PAGAN; RASO, 2000) e enzimas (LÓPEZ et al., 1994; LÓPEZ; BURGOS, 1995[a], 1995[b]; VERCET; LOPEZ; BURGOS, 1997; VILLAMIEL; DE JONG, 2000) relacionados a sucos de frutas, permitindo dessa maneira, o tratamento de alimentos termossensíveis.

As vantagens do uso das ondas sonoras em relação aos tratamentos que empregam calor incluem: minimização da perda de compostos de aroma, especialmente em sucos de frutas, melhor homogeneização e uma maior economia de energia (CROSBY, 1982).

Jang e Moon (2011) estudaram o efeito do tratamento simultâneo com ultra-som e ácido ascórbico sobre a inativação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase de maçã, revelando que o tratamento foi eficaz na inativação das enzimas responsáveis pelo escurecimento do fruto.

Pesquisas sobre o tratamento ultra-sônico de suco de tomate comprovaram que esta tecnologia é capaz de melhorar as características reológicas do produto, através da redução do tamanho das partículas e inativação da enzima pectinametilesterase (TEREFE et al., 2009; VERCET et al., 2002; VILKHU et al., 2008; WU et al., 2008).

Com o intuito de otimizar as condições do processo de sonicação do suco de melão *Cantaloupe* esta pesquisa investigou o efeito da sonicação em parâmetros de qualidade do suco de melão, em função da intensidade de energia ultra-sônica e o tempo de tratamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do suco de melão

O suco de melão *Cantaloupe* foi formulado a partir da polpa da fruta congelada (Tropicássia®) sem a adição de conservantes obtida no comércio local, em uma proporção de 1:1 de água e polpa (± 3°Brix) (BRASIL, 2003).

2.2 Tratamento ultra-sônico

Amostras de 150 mL do suco foram submetidas ao tratamento de ultra-som em um desruptor de células ultra-sônico de 500W (Unique® modelo DES500) com frequência constante de 19kHz e macro ponta de titânio com diâmetro de 13mm (Figura 1). A macro ponta de titânio foi submersa no suco em uma profundidade de 2,5 cm.

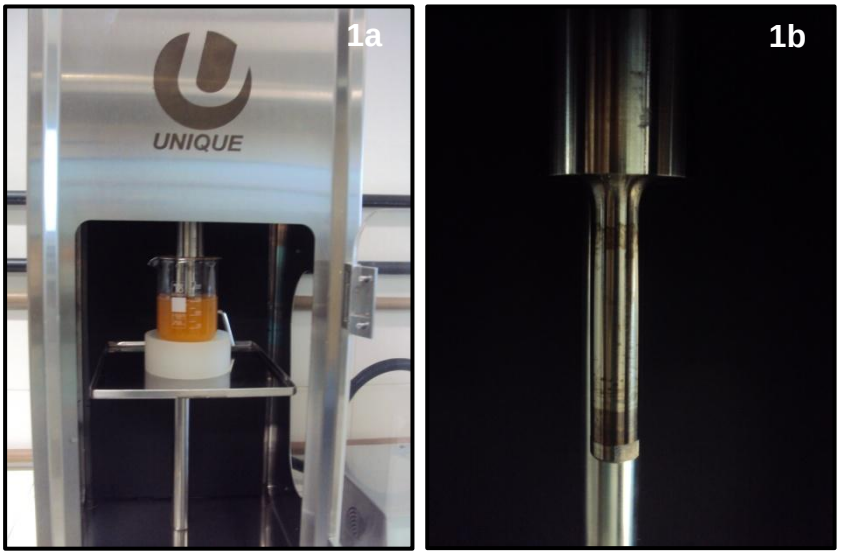


Figura 1: Desruptor de células ultra-sônico (1a) e macro ponta de titânio utilizada (1b).

2.3 Cálculo da intensidade da energia ultra-sônica

A intensidade de energia ultra-sônica dissipada pela ponta de titânio foi calculada de acordo com a Equação 1 (LI, PORDESIMO, WEISS, 2004):

$$I = \frac{P}{\pi r^2} \quad \textbf{(1)}$$

Onde r é o raio (cm) da macro ponta de titânio e P (Watt) é a potência aplicada. No presente estudo os níveis de potência aplicada foram ajustados para 20%, 60% e 99% da potência total (500 W) que equivale a 100, 300 e 495 W, respectivamente. As intensidades ultra-sônicas correspondentes foram 75,34, 226,02 e 372,93 W/cm^2, respectivamente.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Determinação instrumental de cor

A cor dos sucos após a sonicação foi determinada através da medida das coordenadas CIE L*, a* e b*. O equipamento (Minolta® modelo CR300) foi calibrado usando uma placa de referência branca (Y = 94.60, x = 0.3155, y = 0.3321). As coordenadas foram lidas diretamente do aparelho e as diferenças de cor (ΔE), croma (ΔC) e tonalidade (*h*°), em relação ao suco não tratado (amostra padrão), foram calculadas pelas Equações 2, 3 e 4 (FERREIRA, 1991), respectivamente.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2} + \sqrt{(\Delta a^*)^2} + \sqrt{(\Delta b^*)^2} \quad \textbf{(2)}$$

$$\Delta C = \sqrt{(a_0^{*2} + b_0^{*2})} - \sqrt{(a_s^{*2} + b_s^{*2})} \quad \textbf{(3)}$$

$$h° = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad \textbf{(4)}$$

Sendo L* a luminosidade; a* o parâmetro de croma vermelho-verde; b* o parâmetro de croma amarelo-azul. Os subíndices $_0$ e $_s$ representam a amostra padrão e sonificada, respectivamente. Para cada amostra, foram realizadas cinco leituras.

2.4.2 Atividades Enzimáticas

2.4.2.1 *Peroxidase (POX)*

A extração da enzima peroxidase (POD EC 1.11.1.7) foi realizada conforme método de Wissemann e Lee (1980) com modificações. Alíquotas de 10 mL do suco foram adicionadas de 10 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,05M pH 7,0 contendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação (10.733 x *g*/ 30min, a 4ºC). O sobrenadante foi usado como fonte da enzima.

A atividade de POX foi determinada, seguindo metodologia adaptada de Matsuno e Uritani (1972), substituindo-se o substrato o-fenilenodiamina por guaiacol 1% (v/v), adicionado diretamente à solução tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5,0. Em banho-Maria a 30 °C, foram adicionados a tubos de ensaio: 1,5 mL do extrato enzimático, 2,75 mL do tampão fosfato-citrato contendo 1% de guaiacol e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A mistura reacional foi incubada a 30°C por 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de bissulfito de sódio 30% ($NaHSO_3$). As leituras de absorbância foram realizadas a 470 nm considerando-se uma unidade de atividade enzimática (UAE) de peroxidase como a quantidade de atividade enzimática que produz uma mudança de 0,001 unidade de absorbância. Os resultados foram expressos em UAE/min/mL de suco.

2.4.2.2 *Polifenoloxidase (PPO)*

A extração da enzima polifenoloxidase (PPO EC 1.14.18.1) foi realizada conforme método de Wissemann e Lee (1980) com as mesmas modificações adotadas para extração da peroxidase. A atividade enzimática foi determinada incubando-se uma alíquota de 0,3 mL do extrato enzimático e 1,85 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0, contendo 0,1 M de KCl e 0,1 M de catecol, durante 30 minutos, a 30ºC. A reação foi interrompida pela adição de 0,8 mL de ácido perclórico 2 N ($HClO_4$). As leituras de absorbância foram realizadas a 395 nm e considerou-se uma unidade de atividade enzimática (UAE) de polifenoloxidase como

a quantidade de atividade enzimática que produz uma mudança de 0,001 unidade de absorbância. Os resultados foram expressos em UAE/min/mL de suco.

2.4.2.3 *Peroxidase do ascorbato (APx)*

A determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APx EC 1.11.1.11) seguiu metodologia descrita por Nakano e Asada (1981) baseada na oxidação do ascorbato pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Uma alíquota de 4 mL do suco foi adicionada de 10 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 100mM pH 7,0 contendo EDTA 0,01mM. Em seguida a mistura foi submetida à centrifugação (14.000 x *g*/ 30min, a 6ºC). O sobrenadante constituiu-se a fonte de enzima.

Em banho-maria a 30°C, 1.300 µL de tampão fosfato de potássio 50mM pH 6,0 contendo EDTA 0,05mM, foram adicionados de 100µL de extrato enzimático, 50µL de H_2O_2 0,03M e 50µL de ácido ascórbico 15mM. A mistura de reação foi homogeneizada e a atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo da absorbância a 290nm durante 10 minutos sendo quantificada como índice de oxidação do ascorbato. Considerou-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 2,8mM^{-1}. cm^{-1}. A determinação da atividade foi medida em triplicata e os resultados foram expressos em µmol H_2O_2. mL^{-1} de suco. min^{-1}, considerando que é necessário um mol de ascorbato para reduzir um mol de H_2O_2 (AMAKO; CHEN; ASADA, 1994)

2.4.3 Atividade Residual (AR)

As atividades residuais das enzimas POD, PPO e APx após o tratamento de ultra-som foram calculadas através da Equação 5:

$$AR\ (\%) = \frac{A_s}{A_0} * 100 \qquad \textbf{(5)}$$

Onde A_s e A_0 correspondem às atividades enzimáticas das amostras sonificadas e *in natura*, respectivamente.

2.4.4 Determinação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Obanda e Owuor (1997) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau. Ácido gálico (foi utilizado como padrão, em uma curva que variou de 0 a 50 µg de ácido gálico/mL, com leitura espectrofotométrica realizada a 700 nm. A redução de compostos fenólicos no suco sonificado foi calculada de acordo com a Equação 6.

$$\text{Redução (\%)} = \frac{(\text{Fenólicos}_0 - \text{Fenólicos}_s) * 100}{\text{Fenólicos}_0} \quad \textbf{(6)}$$

Os subíndices $_0$ e $_s$ representam a amostra padrão e sonificada, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.5 Estabilidade

A fim de verificar a influência do tratamento ultra-sônico na estabilidade do suco de melão, alíquotas de 5 mL do sobrenadante do suco sonificado e do suco controle foram retiradas. As leituras espectrofotométricas do sobrenadante foram realizadas através da medida da absorbância a 660 nm utilizando água destilada como branco (RANDALL; ROBERT; KAREL, 1997; YEMENICIOGLU; GÜ NAYDIN; CEMEROGLU, 2000).

2.5 Planejamento experimental

Um planejamento experimental (2^2) central compósito foi conduzido para otimizar as condições de processamento ultra-sônico variando-se a intensidade de potência ultra-sônica na faixa de 75,34 a 372,93 W/cm^2 e o tempo de tratamento de 2 a 10 minutos utilizando-se a metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002) para a análise dos resultados. Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Fatores independentes e níveis utilizados para a otimização do processo de sonificação de suco de melão

Fatores Independentes	**Níveis codificados**		
	-1	**0**	**+1**
Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)	75,34	226,02	372,93
Tempo (min)	2	6	10

Tabela 2: Planejamento experimental utilizado para otimização das condições de processamento ultra-sônico

Ensaio	**Potência (%)**	**Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)**	**Tempo (min)**
1	20	75,34	2
2	20	75,34	10
3	99	372,93	2
4	99	372,93	10
5	20	75,34	6
6	99	372,93	6
7	60	226,02	2
8	60	226,02	10
9	60	226,02	6
10	60	226,02	6
11	60	226,02	6

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cor

Melões da variedade *Cantaloupe* possuem polpa de coloração alaranjada ou salmão devido principalmente a pigmentos carotenóides, dos quais o β-caroteno é o principal componente (IBDAH et al., 2006; PRATT, 1971).

A metodologia de superfície de resposta não foi utilizada para a análise dos resultados de degradação da cor do suco sonificado uma vez que estes não apresentaram significância estatística a 95% de confiança. Dessa forma, as médias dos valores obtidos foram comparadas através do teste de Tukey.

Nas condições de processamento estudadas, houve um aumento significativo de a* nos tratamentos 2, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (Tabela 3) em relação ao controle. Como o parâmetro a* varia do índice de saturação verde (-) ao vermelho (+), os valores indicam uma maior intensidade da tonalidade vermelha do suco. Nos demais ensaios do planejamento não houve diferença significativa do controle ($p<0,05$).

Com relação ao parâmetro b*, os tratamentos 1, 4 e 5 apresentaram valores mais próximos ao suco *in natura* com grau de significância de $p<0,05$, (Tabela 3). Este fato parece estar mais associado à potência utilizada do que ao tempo de tratamento, uma vez que os tratamentos 1 e 5 foram conduzidos na mesma potência em tempos de tratamento distintos. O aumento de valor do parâmetro b* indica a intensificação da cor amarela da solução.

Segundo Ahmed, Shivhare e Kaur (2002) qualquer mudança nos valores dos parâmetros a* e b* está associada a uma mudança simultânea no valor de L*. Após a sonificação, os valores da luminosidade (L*) para todos os tratamentos foram significativamente mais baixos, em relação ao suco *in natura* ($p<0,05$), com exceção dos tratamentos 1, 4, e 7, os quais não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p<0,05$).

Tabela 3: Influência do tratamento ultra-sônico na variação da cor do suco melão em relação ao suco *in natura* [(1)]

Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)	Tempo (min)	Ensaio	L*	a*	b*	*h*°	ΔC	ΔE
75,34	2	1	72,13 ± 0,90^{g,h}	6,81 ± 0,65^{a}	21,22 ± 1,02^{a,b}	72,25 ± 0,83^{b}	-0,87 ± 0,28^{c,d}	1,74 ± 0,43^{a}
75,34	10	2	68,55 ± 1,00^{c,d,e}	9,95 ± 0,74^{f,g}	25,94 ± 0,87^{c,e}	69,04 ± 0,79^{e}	4,63 ± 0,71^{a,e}	5,67 ± 0,99^{b}
372,93	2	3	73,72 ± 0,38^{g}	6,41 ± 0,29^{a}	20,37 ± 0,55^{a}	72,53 ± 0,32^{b}	-1,79 ± 0,41^{c}	2,85 ± 0,98^{a,b}
372,93	10	4	70,10 ± 0,56^{e,f}	8,26 ± 0,47^{c,e}	22,15 ± 0,68^{a,b}	70,57 ± 0,50^{d,f}	0,49 ± 0,15^{d}	1,70 ± 0,41^{a}
75,34	6	5	72,95 ± 0,61^{g}	6,98 ± 0,49^{a,c}	21,40 ± 0,88^{,b}	71,92 ± 0,50^{b,d}	-0,66 ± 0,23^{c,d}	1,78 ± 0,70^{a}
372,93	6	6	67,00 ± 0,81^{a,b,c}	11,37 ± 0,58^{b,d}	26,71 ± 0,53^{c,d}	66,94 ± 0,64^{a,c}	5,88 ± 0,60^{a,b}	7,75 ± 0,99^{b,c}
226,02	2	7	69,65 ± 0,54^{d,e,f}	9,16 ± 0,40^{e,f}	24,70 ± 0,52^{e}	69,65 ± 0,42^{e,f}	3,18 ± 0,63^{e}	3,90 ± 0,50^{a,b}
226,02	10	8	67,40 ± 0,74^{a,c}	10,54 ± 0,69^{d,g}	24,69 ± 0,72^{e}	67,35 ± 0,75^{a}	4,21 ± 0,33^{a,e}	6,32 ± 0,30^{b}
226,02	6	9	68,10 ± 0,68^{b,c,d}	11,47 ± 0,48^{b,d}	27,20 ± 0,43^{c,d}	67,13 ± 0,54^{a}	6,37 ± 0,59^{a,b}	7,64 ± 0,68^{b,c}
226,02	6	10	65,90 ± 0,31^{a}	12,65 ± 0,33^{b}	27,94 ± 0,31^{d}	66,39 ± 0,33^{c}	7,51 ± 0,42^{b}	9,91 ± 0,55^{c}
226,02	6	11	66,58 ± 0,44^{a,b}	11,90 ± 0,27^{b}	27,56 ± 0,18^{c,d}	66,64 ± 0,34^{a,c}	6,86 ± 0,27^{b}	8,88 ± 0,51^{c}
		Controle	71,00 ± 0,79^{f,h}	7,27 ± 0,44^{a,c}	22,70 ± 0,89^{b}	71,97 ± 0,82^{b,d}	-----	-----

[(1)] Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; L* (luminosidade); a* (croma verde-vermelho); b* (croma azul-amarelo); *h*° (tonalidade); ΔE (variação total de cor); ΔC (índice de croma). Valores são: média ± desvio padrão (n=5).

Um decréscimo da luminosidade pode estar associado à formação de compostos escuros decorrentes de reações de escurecimento enzimático e não enzimático. As mudanças de cor observadas podem estar associadas à cavitação[1] que pode acelerar várias reações físicas, químicas e biológicas (SALA et al., 1995). Durante o tratamento ultra-sônico, ocorre a ruptura das membranas celulares e complexos proteínas-carotenóides que conferem uma maior homogeneização e consequente intensificação da coloração laranja do suco durante a sonicação.

Por outro lado, Chen, Peng e Chen (1995) reportaram que as condições extremas de temperatura e pressão que ocorrem durante a sonicação podem acelerar a isomerização de carotenóides. Logo, pode-se também associar a intensificação da coloração vermelha do suco à isomerização de compostos carotenóides presentes na variedade de melão utilizada neste estudo.

No estudo de Sun et al. (2010) foi demonstrado que a taxa de degradação do β-caroteno é diminuída quando há um aumento na intensidade ultra-sônica e temperatura. Os autores afirmam que em maiores potências de ultra-som, as bolhas formadas durante a cavitação podem ser muito grandes para colapsarem ou essas bolhas colapsam menos violentamente, o que pode causar uma redução dos efeitos da cavitação. Nessas condições, as bolhas podem ainda, atrapalhar a propagação das ondas ultra-sônicas.

Adekunte et al. (2010) também reportaram mudanças na cor de suco de tomate após tratamento de ultra-som. Porém, a sonicação resultou em decréscimo nos valores dos parâmetros L*, a* e b* e um aumento no valor de ΔE, indicando haver degradação de carotenóides (licopeno).

O índice de saturação (ΔC) e o ângulo de tonalidade (*h*°) podem melhorar o entendimento das variações da cor encontradas nas amostras. O ΔC indica a variação do grau de intensidade do croma (a* e b*) da amostra tratada com relação à fresca. Quanto menor o valor, menor a variação. Desta forma, as amostras submetidas aos tratamentos 1, 3, 4 e 5 apresentaram os menores valores de ΔC mostrando haver pouca diferença dessas amostras em relação ao controle. Por sua vez, os valores do ângulo de tonalidade (*h*°) confirmam os dados acima uma vez que

[1] Processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultra-sônicas de baixa frequência (< 1 MHz) (SUSLICK, 1989).

os tratamentos 1, 3, 4 e 5 não apresentaram diferença significativa desse parâmetro ($p<0,05$) em relação ao controle (Tabela 3).

Diferenças perceptíveis nos parâmetros de cor podem ser analiticamente classificadas em: muito distintas ($\Delta E > 3$), distintas ($1.5 < \Delta E < 3$) e ligeiramente distintas ($\Delta E < 1.5$). Choi, Kim e Lee (2002) sugeriram que um $\Delta E > 2$ corresponde a diferenças visualmente perceptíveis em diversos produtos.

A diferença total de cor, válida para uma comparação geral dos processos, apresentou resultados de -0,87 ± 0,43; -1,79 ± 0,98; 0,49 ± 0,41 e -0,66 ± 0,70 para os tratamentos 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Tabela 3). Esses valores apontam não haver uma mudança de cor perceptível nas condições experimentadas nesses ensaios.

A condição de processamento ultra-sônico na qual se obteve a melhor retenção das características de cor do suco de melão foi onde se aplicou a maior intensidade ultra-sônica e o maior tempo de tratamento (372,93 W/cm^2/10min).

Tiwari, O'Donnell e Cullen (2009) obtiveram resultados similares aos encontrados neste estudo ao investigar a sonicação do suco de blackberry. O suco reteve um teor significante de antocianinas (>94%) nas condições máximas de processamento (22,79 W/cm^2/10min), indicando a estabilidade das antocianinas durante a sonicação.

3.2 Influência do ultra-som na atividade enzimática

3.2.1 Peroxidase (POD)

A atividade da enzima peroxidase em vegetais é responsável pelo surgimento de *off-flavours* e mudanças de cor indesejáveis. PODs estão presentes em tecidos vegetais na forma de variadas isoenzimas variando em especificidade de substrato, estabilidade térmica, peso molecular e ponto isoelétrico (ROBINSON, 1991). As isoenzimas de POD atuam sobre diferentes substratos, em reações, tais como: oxidação de fenólicos e carotenóides, degradação de auxinas, de clorofila e de ácido ascórbico, bem como na biossíntese da lignina. Portanto, a sua atividade relaciona-se com modificações nos atributos sensoriais (escurecimento, endurecimento, sabores estranhos) e no valor nutritivo (perda de atividade vitamínica do ácido

ascórbico) dos alimentos vegetais (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A atividade peroxidásica do suco de melão *in natura* utilizado neste estudo foi de 207,95 ± 2,09 UAE/min/mL.

Os resultados de atividade residual de peroxidase após a sonicação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Influência do tratamento ultra-sônico na inativação da peroxidase do suco melão [(2)]

Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)	**Tempo (min)**	**Ensaio**	**Atividade residual $_{POD\ (\%)}$**
75,34	2	1	114,34 ± 2,67
75,34	10	2	121,03 ± 2,22
372,93	2	3	119,38 ± 1,63
372,93	10	4	23,29 ± 3,40
75,34	6	5	113,40 ± 1,95
372,93	6	6	127,36 ± 0,48
226,02	2	7	114,62 ± 1,67
226,02	10	8	96,41 ± 0,87
226,02	6	9	126,22 ± 0,81
226,02	6	10	126,71 ± 1,50
226,02	6	11	125,44 ± 1,69

[(2)] Valores são: média ± desvio padrão (n=3).

Observou-se uma redução de atividade enzimática nos ensaios 4 e 8. Porém, o maior nível de redução da atividade da enzima (23,29%) foi atingido com aplicação de maior intensidade e tempo de tratamento (ensaio 4). Nos demais ensaios do planejamento o tratamento ultra-sônico aumentou a atividade da peroxidase chegando a cerca de 30% de incremento.

O'Donnell et al. (2010) afirmam que a intensidade de ultra-som influencia de maneira importante no efeito da sonicação na atividade enzimática. Diversas pesquisas têm comprovado que a atividade de enzimas livres aumenta sob irradiação ultra-sônica moderada (CHOI; KIM, 1994; SAKAKIBARA et al., 1996). O

aumento de atividade observado neste estudo pode ser atribuído ao rompimento das células causado pelas ondas ultra-sônicas que proporciona maior contato da enzima com o substrato.

A intensidade cavitacional tem sido um dos principais mecanismos propostos de inativação enzimática de alimentos submetidos ao tratamento ultra-sônico. A formação de bolhas de cavitação resulta em força de atrito que pode desnaturar as proteínas. As enzimas também podem ser desnaturadas pelos radicais livres gerados durante a sonólise das moléculas de água (MASON, 1998; SUSLICK, 1989).

O gráfico de Pareto (Figura 2) apresenta os efeitos das variáveis independentes intensidade ultra-sônica e tempo de tratamento na atividade da enzima peroxidase. Observa-se que no intervalo de confiança de 90%, o efeito do tempo (linear e quadrático) e da interação intensidade *versus* tempo apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática. Ou seja, um aumento simultâneo de potência e tempo leva a uma maior redução da atividade de peroxidase.

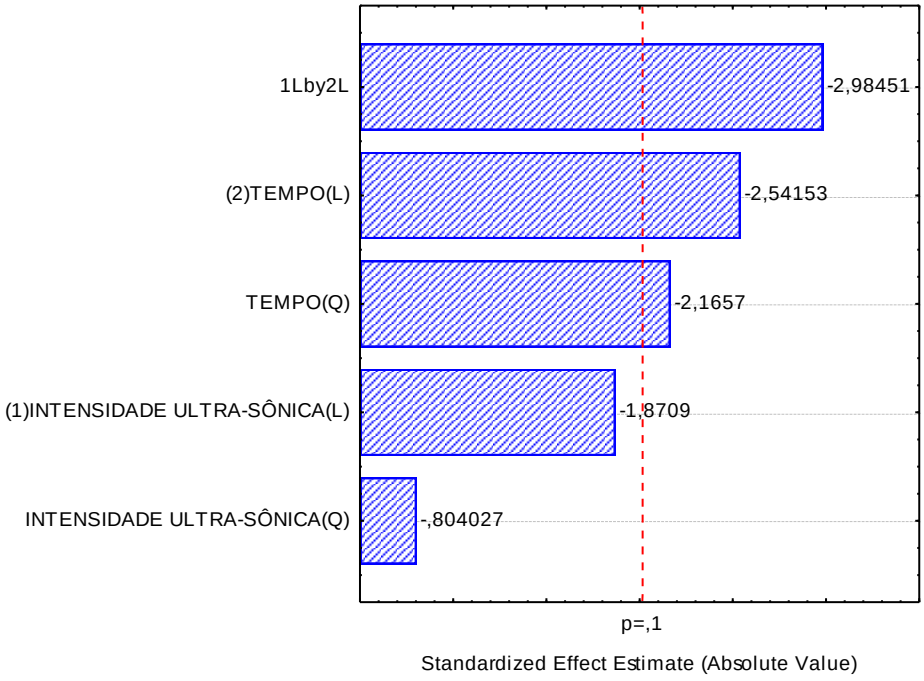


Figura 2: Efeitos estimados sobre a atividade da enzima peroxidase (POD).

O modelo de regressão obtido para predizer a atividade residual de peroxidase após sonicação está representado pela equação 7.

$$\mathbf{AR_{POD\ (\%)}} = 43{,}68 + 0{,}35*x - 0{,}0004*x^2 + 22{,}73*y - 1{,}46*y^2 - 0{,}43*x*y + 0 \qquad \textbf{(7)}$$

Onde:

x = Potência (W/cm^2);
y = Tempo de tratamento (min).

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Análise de variância para atividade residual de peroxidase (POD)

Fonte de variação	**Soma quadrática**	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**Valor de *F***
Regressão	7569,903	5	1513,980	5,13
Residual	1475,883	5	295,177	
Total	9045,786	10		
Coeficiente de determinação	0,84			
F tabelado (90%)				5,05

De acordo com a tabela de ANOVA, o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática foi 5,13, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 90% de confiança, assim o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com o teste F.

Através do gráfico de superfície de resposta (Figura 3) é possível observar que as menores atividades residuais são obtidas em tratamentos que combinam as maiores potências e tempos, conforme efeito apresentado no diagrama de Pareto.

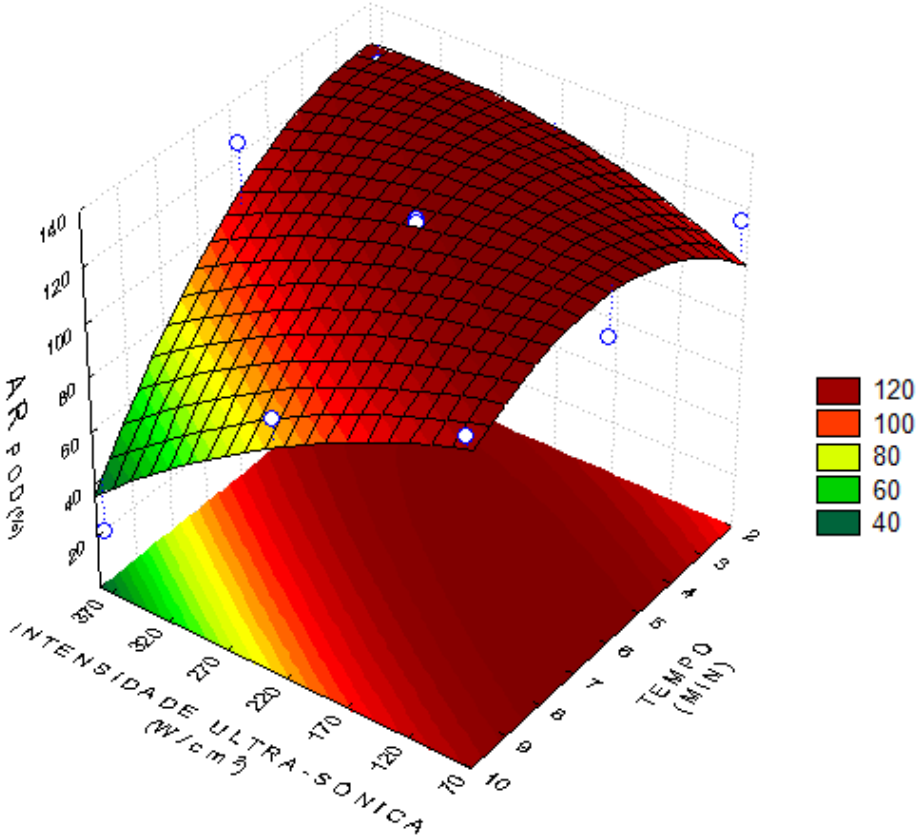


Figura 3: Superfície de resposta para a atividade residual da enzima peroxidase (POD).

Resultados divergentes foram publicados por Wu e Lin (2002) que relataram haver um aumento da atividade de POD de ginseng proporcional ao aumento da intensidade ultra-sônica.

De Gennaro et al., (1999) reportaram que a aplicação de ondas ultra-sônicas é capaz de reduzir o tempo de redução decimal de peroxidase a 80°C (D80) de 65 para 10 minutos. Os autores afirmam ainda que o valor D80 varia com a potência ultra-sônica, a geometria da macro ponta de titânio e o volume da suspensão submetida ao tratamento ultra-sônico.

O tratamento de suco de melão *Cantaloupe* com CO_2 supercrítico a 35 MPa e 55 °C durante 60 minutos resultou em uma atividade residual de peroxidase (POD) de 38,46% (CHEN et al., 2010), inativação inferior a encontrada neste trabalho utilizando intensidade ultra-sônica de 372,93 W/cm^2 por 10 minutos a temperatura ambiente.

Lamikanra e Watson (2000) caracterizaram a atividade de peroxidase de melões *Cantaloupe* e observaram uma redução de 90% na atividade em um tratamento térmico a 80°C por 5 minutos. No entanto, o tratamento térmico deste suco é problemático uma vez que os compostos de aroma do suco de melão são extremamente sensíveis ao calor, resultando em produtos de qualidade inferior (GALEB; WROLSTAD; McDANIEL, 2002; WANG et al., 2006). Logo, o uso do ultra-som pode ser uma tecnologia eficaz para reduzir a atividade de enzimas deteriorantes no suco de melão sem causar perdas à qualidade do produto.

3.2.2 Polifenoloxidase (PPO)

A Tabela 6 apresenta as atividades residuais de polifenoloxidase do suco de melão após a aplicação de ultra-som.

Tabela 6: Influência do tratamento ultra-sônico na inativação da polifenoloxidase do suco melão [(3)]

Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)	Tempo (min.)	Ensaio	Atividade residual $_{PPO\ (\%)}$
75,34	2	1	88,18 ± 1,80
75,34	10	2	85,66 ± 1,92
372,93	2	3	84,14 ± 1,05
372,93	10	4	70,48 ± 1,46
75,34	6	5	89,12 ± 0,95
372,93	6	6	88,46 ± 1,15
226,02	2	7	90,81 ± 1,26
226,02	10	8	77,60 ± 1,53
226,02	6	9	87,85 ± 1,83
226,02	6	10	89,54 ± 1,33
226,02	6	11	87,78 ± 1,73

[(3)] Valores são: média ± desvio padrão (n=3).

Observou-se uma redução da atividade de PPO em todos os ensaios do planejamento. Porém, nos ensaios 4 e 8, a redução da atividade da enzima foi maior atingindo 70,48% e 77,60% de atividade residual, respectivamente. A atividade da enzima polifenoloxidase da amostra controle foi 240,95 ± 4,09 UAE/min/mL, valor considerado baixo se comparado a outras frutas como manga (543,48 UAE/g da massa fresca/min.) (LUCENA, 2006) e maçã (1.499 UAE/g de massa fresca/min) (ROCHA; MORAIS, 2001).

A Figura 4 apresenta os efeitos das variáveis independentes potência e tempo de tratamento na atividade da enzima polifenoloxidase. Observa-se que no intervalo de confiança de 95%, os efeitos do tempo (linear e quadrático) e da potência linear apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática. O efeito quadrático da intensidade ultra-sônica revela que, nas condições experimentais estudadas, um aumento da potência não resultaria em uma diminuição significativa da atividade de polifenoloxidase, uma vez que este efeito foi pequeno e não foi significativo.

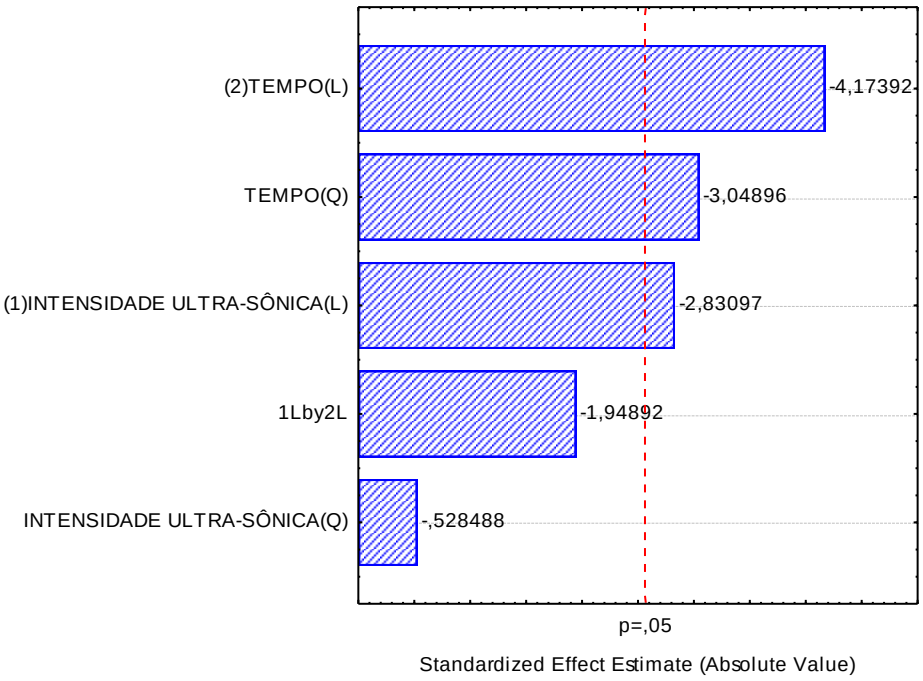


Figura 4: Efeitos estimados da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO).

O modelo de regressão obtido para a atividade residual de PPO está expresso pela equação 8.

$$\mathbf{AR_{PPO\ (\%)}} = 80{,}44 + 0{,}02*x - 0{,}00004*x^2 + 3{,}95*y - 0{,}34*y^2 - 0{,}005*x*y + 0 \qquad \textbf{(8)}$$

Onde:
x = Potência (W/cm^2);
y = Tempo de tratamento (min).

De acordo com a tabela de ANOVA (Tabela 7), o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática foi 8,10, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança, assim o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com o teste F.

Tabela 7: Análise de variância para atividade residual de polifenoloxidase (PPO)

Fonte de variação	**Soma quadrática**	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**Valor de *F***
Regressão	333,16	5	66,632	8,10
Residual	41,1451	5	8,2290	
Total	374,3051	10		
Coeficiente de determinação	0,90			
F tabelado (95%)				5,05

Através do gráfico de superfície de resposta (Figura 5), é possível observar que o efeito combinado de altas potências e tempos de tratamento levam a uma maior redução da atividade de PPO, assim como foi observado para a atividade residual de peroxidase.

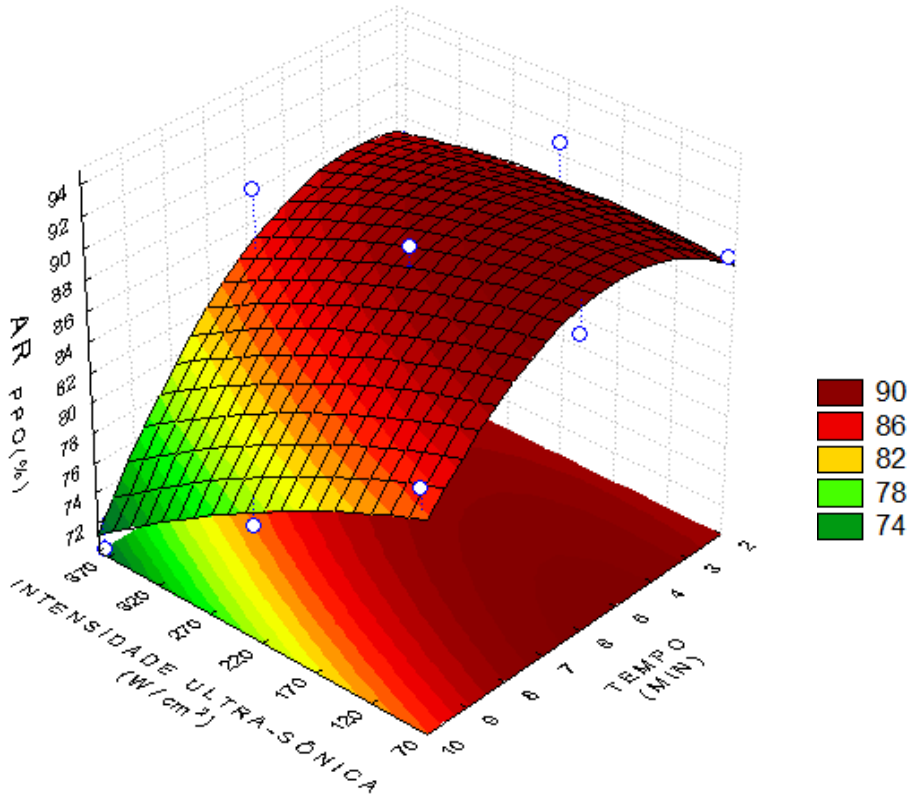


Figura 5: Efeito da potência e do tempo de tratamento na inativação da enzima polifenoloxidase (PPO).

Jang e Moon (2011) estudaram a inativação das enzimas PPO e POD em maçãs através do uso combinado de tratamento ultra-sônico e ácido ascórbico. Os resultados revelaram que o uso isolado do ultra-som não foi eficaz na inativação das enzimas levando a um aumento discreto da atividade de PPO. Por outro lado, o tratamento com o uso simultâneo de ultra-som e ácido ascórbico teve efeito inibitório sinérgico sobre as enzimas envolvidas no escurecimento da fruta.

A ação das peroxidases e polifinoloxidases é sinérgica. As PODs têm seu papel no escurecimento enzimático limitado pela disponibilidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Geralmente, ela incrementa a degradação de fenóis, quando a PPO está presente, gerando o H_2O_2 para sua ação. Além disso, as quinonas formadas podem ser substratos para a POD (ROBARDS et al. 1999).

A condição experimental que melhor favoreceu simultaneamente a redução da atividade das enzimas POD e PPO foi aquela na qual foi empregada intensidade ultra-sônica de 372,93 W/cm^2 durante 10 minutos.

3.2.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A enzima peroxidase do ascorbato possui propriedades antioxidantes e, portanto, ajuda a reduzir a velocidade de reações deteriorativas (SHIBATA et al., 1995; SINGH et al., 1998; WANG, 1995).

Os resultados de atividade residual da enzima APx após o tratamento no ultra-som estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Influência do tratamento ultra-sônico na inativação da enzima APx do suco melão [(4)]

Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)	Tempo (min.)	Ensaio	Atividade residual $_{APx\ (\%)}$
75,34	2	1	43,26 ± 1,83
75,34	10	2	35,23 ± 1,46
372,93	2	3	41,12 ± 2,43
372,93	10	4	0,00 ± 1,56
75,34	6	5	51,67 ± 1,49
372,93	6	6	36,26 ± 1,82
226,02	2	7	26,00 ± 2,30
226,02	10	8	0,00 ± 1,05
226,02	6	9	43,38 ± 1,14
226,02	6	10	39,51 ± 1,77
226,02	6	11	44,46 ± 1,09

[(4)] Valores são média ± desvio padrão (n=3).

O tratamento ultra-sônico foi capaz de reduzir 100% da atividade da enzima peroxidase do ascorbato, (ensaios 4 e 8). Nos demais tratamentos a atividade residual de APx não ultrapassou 52%.

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 6), pode-se observar que todos os parâmetros avaliados tiveram influência significativa no intervalo de confiança de 95%, destacando-se o efeito do tempo (linear e quadrático) como mais pronunciado.

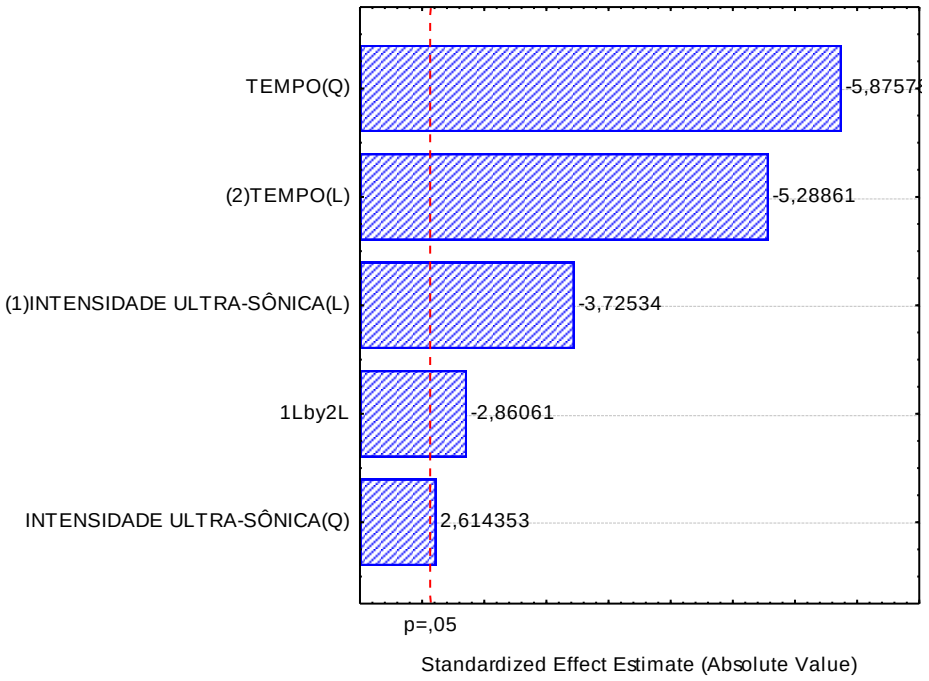


Figura 6: Efeitos estimados sobre a atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APx).

O modelo de regressão obtido para a atividade residual de APx está expresso pela Equação 9.

$$\mathbf{AR_{APx\ (\%)}} = 26{,}13 - 0{,}17*x + 0{,}0004*x^2 + 16{,}01*y - 1{,}33*y^2 - 0{,}001*x*y + 0 \qquad \textbf{(9)}$$

Onde:

x = Potência (W/cm^2);

y = Tempo de tratamento (min).

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9: Análise de variância para atividade residual de peroxidase do ascorbato (APx)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de *F*
Regressão	2876,786	5	575,3272	17,20
Residual	167,324	5	33,465	
Total	3044,110	10		
Coeficiente de determinação	0,94503			
F tabelado (95%)				5,05

De acordo com a tabela de ANOVA, o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática foi 17,20, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança, assim o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com o teste F.

Analisando a Figura 7, observa-se que a superfície de resposta obtida apresentou um ponto de cela. Neste caso, o modelo estimado não possui um único ponto ótimo.

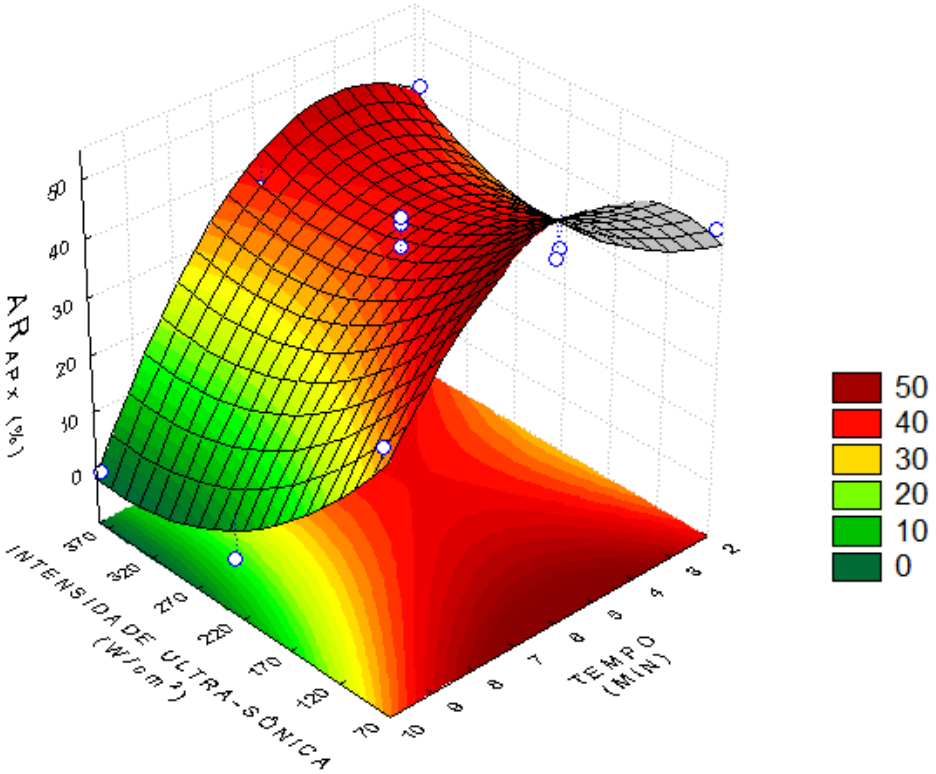


Figura 7: Efeito da potência e do tempo de tratamento na inativação da enzima peroxidase do ascorbato (APx).

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com os de Zapata, Sabater e Martin (1998) que reportaram que a peroxidase do ascorbato é mais instável que outros tipos de peroxidase.

Os resultados apontaram que o uso da tecnologia ultra-sônica é viável para a inativação de enzimas envolvidas no processo de deterioração de alimentos, como os sucos de frutas. Sala et al. (1995) indicaram o uso do ultra-som associado com calor para reduzir a severidade dos tratamento térmicos.

3.3 Redução de compostos fenólicos

A Tabela 10 apresenta os resultados de Influência do tratamento ultra-sônico na concentração de compostos fenólicos do suco melão.

Tabela 10: Influência do tratamento ultra-sônico na concentração de compostos fenólicos do suco melão [(5)]

Intensidade ultra-sônica (W/cm^2)	Tempo	Ensaio	Fenólicos totais (µg ác. gálico/100mL)	Redução de fenólicos (%)
75,34	2	1	$9,69 \pm 0,60^{c}$	34,02 ± 2,10
75,34	10	2	$11,86 \pm 0,23^{a,b,c}$	19,24 ± 1,62
372,93	2	3	$10,62 \pm 0,15^{a,b,c}$	27,72 ± 1,04
372,93	10	4	$11,42 \pm 1,09^{a,b,c}$	22,26 ± 0,99
75,34	6	5	$10,27 \pm 0,28^{b,c}$	30,07 ± 1,04
372,93	6	6	$11,53 \pm 0,77^{a,b,c}$	21,50 ± 0,87
226,02	2	7	$10,89 \pm 0,39^{a,b,c}$	25,87 ± 0,77
226,02	10	8	$11,52 \pm 1,61^{a,b,c}$	21,59 ± 1,34
226,02	6	9	$12,64 \pm 0,16^{a}$	14,78 ± 1,09
226,02	6	10	$12,43 \pm 0,17^{a}$	15,37 ± 1,16
226,02	6	11	$12,28 \pm 0,47^{a,b}$	16,38 ± 1,20
		Controle	$14,69 \pm 0,56^{d}$	

[(5)] Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores são: média ± desvio padrão (n=3).

A metodologia de superfície de resposta não foi utilizada para avaliar a redução de compostos fenólicos do suco sonificado uma vez que as variações do tempo e da intensidade ultra-sônica não apresentaram efeito significativo na resposta analisada (concentração de fenólicos). As médias dos valores obtidos foram comparadas através do teste de Tukey.

Embora não tenha sido possível a obtenção de um modelo matemático significativo para a descrição do efeito das variáveis independentes na redução dos fenólicos, em todos os tratamentos houve uma redução significativa nos teores destes compostos, atingindo cerca de 30% de redução.

A formação de radicais livres pode ter influenciado na redução dos compostos fenólicos do suco de melão. Os radicais •OH formados durante a cavitação podem afetar a bioatividade de componentes alimentícios, como os compostos fenólicos (WAN et al., 2005). Em processos de extração de compostos fenólicos por ultra-som, os radicais livres precisam ser extintos através da incorporação de aditivos selecionados tais como ácido ascórbico ou etanol (ASHOKKUMAR et al., 2008).

Resultados divergentes foram publicados por Lieu e Le (2010) que avaliaram a aplicação de tratamento ultra-sônico em mosto de uva e constataram que as amostras sonificadas tiveram um incremento de 114,3% na concentração de compostos fenólicos totais.

3.3 Efeito do ultra-som na estabilidade do suco de melão

A turbidez dos sucos de frutas é formada por partículas finamente divididas de pectina, celulose, hemicelulose, proteínas e lipídios em suspensão (IRWE; OLSSON, 1994; KLAVONS; BENNETT; VANNIER, 1994) é uma característica desejável uma vez que afeta favoravelmente o *flavour* e a cor do suco. Apenas os sucos submetidos às condições dos ensaios 2, 4 e 8 ficaram completamente homogêneos durante o período do ensaio (6 semanas em estocagem refrigerada).

Nestes experimentos, os sucos foram tratados por 10 minutos em intensidades ultra-sônicas de 75,34, 372,93 e 226,02 W/cm^2, respectivamente, confirmando que a estabilidade da turbidez do suco sofreu um maior efeito do tempo de tratamento em relação à intensidade ultra-sônica, uma vez que para tempos de tratamento menores não houve preservação da homogeneidade do produto.

As Figuras 8 e 9 apresentam uma comparação do suco submetido à sonicação com intensidade ultra-sônica de 372,93W/cm^2 durante 10 minutos com o suco controle onde a estabilidade do suco sonificado teve um incremento da ordem de 28 vezes em relação ao suco controle.

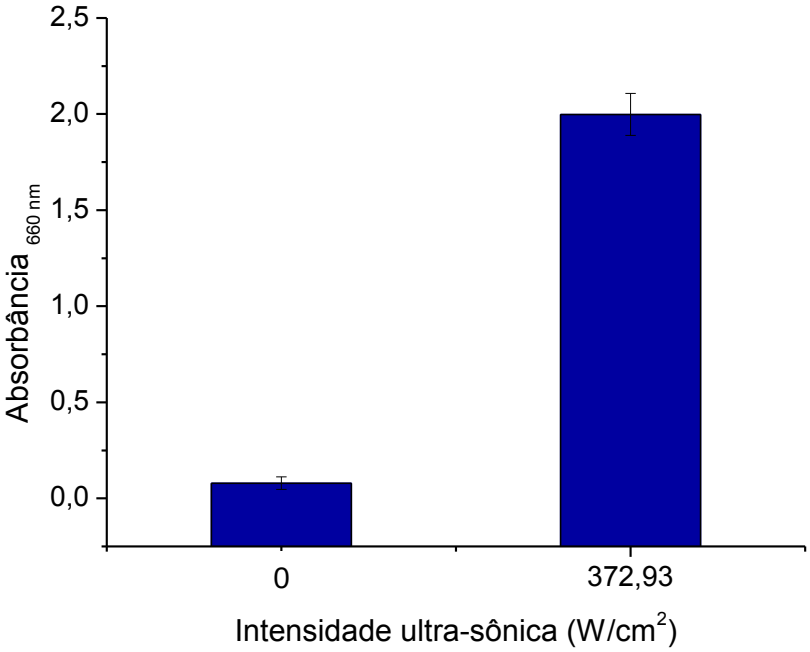


Figura 8: Efeito da intensidade ultra-sônica na estabilidade do suco de melão controle e sonificado (372,93 W/cm^2/10min).

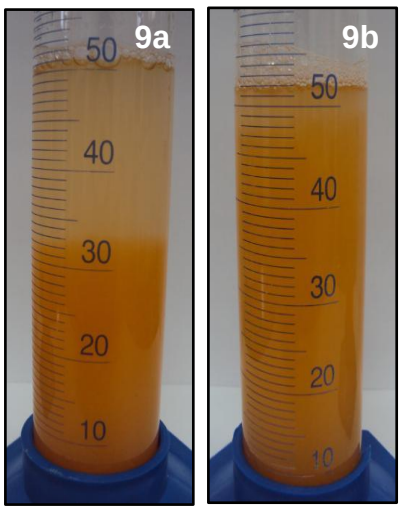


Figura 9: Aspecto do suco controle (9a) e sonificado (9b).

Os processadores ultra-sônicos reduzem as pequenas partículas em um líquido proporcionando uma melhor uniformidade e estabilidade. A redução do diâmetro médio das partículas aumenta o número de partículas individuais. Isto leva a uma redução da distância média e um aumento da superfície das partículas, alterações que podem influenciar a reologia de um líquido (RAO, 1999).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de Tiwari et al. (2009) que observaram a maior estabilidade do suco de laranja submetido à sonicação. Os autores atribuem a maior estabilidade das partículas em suspensão do suco à redução das mesmas após o tratamento ultra-sônico. Além disso, os mesmos sugerem que a atividade da enzima pectinametilesterase (PME) e suas interações com o seu substrato (pectina) tenham um grande impacto na estabilidade do suco de laranja. Por outro lado, Wu et al. (2008) observaram que a redução do tamanho das partículas em suco de tomate sonificado mostrou-se ser mais dependente da amplitude do que da inativação da PME.

4. CONCLUSÕES

- A condição de processamento ultra-sônico na qual se obteve a melhor retenção das características de cor do suco de melão foi onde se aplicou a maior intensidade ultra-sônica e o maior tempo de tratamento (372,93 W/cm^2/10min);
- A condição experimental que melhor favoreceu simultaneamente a redução da atividade das enzimas POD e PPO foi aquela na qual foi empregada intensidade ultra-sônica de 372,93 W/cm^2 durante 10 minutos;
- O tratamento ultra-sônico reduziu significativamente os teores de compostos fenólicos do suco de melão atingindo cerca de 30% de redução;
- A estabilidade da turbidez do suco de melão foi melhorada sob efeito do tratamento ultra-sônico permanecendo completamente homogêneo durante 6 semanas de estocagem refrigerada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEKUNTE, A. O.; B.K. TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; SCANNELL, A. G. M.; O'DONNELL, C. P. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v.122, p.500-507, 2010.

2. AHMED, J., SHIVHARE, U. S., KAUR, M. Thermal colour degradation kinetics of mango puree. **International Journal of Food Properties**, v.5, p.359-366, 2002.

3. AMAKO, K.; CHEN, G. X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiology**, v.35, p.497-504, 1994.

4. ASHOKKUMAR, M.; SUNARTIO, D.; KENTISH, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; VILKHU, K.; VERSTEEG, C. K. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.155-160, 2008.

5. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de Experimentos**, Campinas: Editora da UNICAMP, Brasil, 2002.

6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 12, de 4 de setembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade Gerais para suco tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos sucos tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá Pêssego e Pitanga. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 set. 2003. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: maio. 2009.

7. BARTH, M. M., L. A.; WESTON; H.; ZHUANG. Influence of clomazome herbicide on postharvest quality of processing squash and pumpkin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.2389-2393, 1995.

8. CHEN, H. E.; PENG, H. Y.; CHEN, B. H. Changes of carotenoids colour and vitamin A contents during processing of carrot juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1912-1918, 1995.

9. CHEN, J. L.; ZHANG, J.; SONG, L.; JIANG, Y.; WU, J.; HU, X. S. Changes in microorganism, enzyme, aroma of hami melon (*Cucumis melo L.*) juice treated with dense phase carbon dioxide and stored at 4 °C. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p.623-629, 2010.

10. CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

11. CHOI, J. H.; KIM, S. B. Effect of ultrasound on sulphuric acid-catalysed hydrolysis of starch. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.11, p.178-184, 1994.

12. CHOI, M. H.; KIM, G. H.; LEE, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice colour and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. **Food Research International**, v.35, p.753-759, 2002.

13. CROSBY, L. Juices pasteurized ultrasonically. **Food Production/ Management**, Set., p.16, 1982.

14. DE GENNARO, L.; CAVELLA, S.; ROMANO, R.; MASI, P. The use of ultrasound in food technology I: inactivation of peroxidase by thermosonication. **Journal of Food Engineering**, v.39, p.401-407, 1999.

15. FERREIRA, V. L. **Colorimetria em alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. 42 p.

16. FONTES, P. R.; RAMOS, E. Novas tecnologias não-térmicas. In: BARROS, M. S. R. (Org.). **Ferramentas da ciência e tecnologia para a segurança dos alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. cap.3. p.87.

17. GALEB, A. D. S.; WROLSTAD, R. E.; McDANIEL, M. R. Composition and quality of clarified *Cantaloupe* juice concentrate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.26, p.39-56, 2002.

18. GUERRERO, S.; LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.2, p.31-39, 2001.

19. HUNTER, G.; LUCAS, M.; WATSON, I.; PARTON, R. A radial mode ultrasonic horn for the inactivation of *Escherichia coli* K12, **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.101-109, 2008.

20. IBDAH, M.; AZULAY, Y.; PORTNOY, V.; WASSERMAN, B.; BAR, E.; MEIR, A.; BURGER, Y.; HIRSCHBERG, J.; SCHAFFER, A. A.; KATZIR, N.; TADMOR, Y.; LEWINSOHN, E. Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. **Phytochemistry**, v.67, p.1579-1589, 2006.

21. IRWE, S.; OLSSON, I. Reduction of pectinesterase activity in orange juice by high pressure treatment. In: SINGH, R. P., OLIVEIRA, F. A. R. (Eds.). **Minimal Processing of Foods and Process Optimizations an Interface**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.35-42.

22. JANG, J. H.; MOON, K. D. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. **Food Chemistry**, v.124, p.444-449, 2011.

23. KLAVONS, J. A.; BENNETT, R. D.; VANNIER, S. H. Physical/chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud. **Journal of Food Science**, v.59, p.399-401, 1994.

24. LAMIKANRA, O.; WATSON, M. A. *Cantaloupe* melon peroxidase. In: LAMIKANRA, O.; CHEN, J. C.; BANKS, D.; HUNTER, P. A. Biochemical and microbial changes during the storage of minimally processed *Cantaloupe*. **Journal Agriculture Food Chemical**, v.48, p.5955-5961, 2000.

25. LI, H. Z.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v.37, p.731-738, 2004.

26. LIEU, L. N.; LE, V. V. M. Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, p.273-279, 2010.

27. LÓPEZ, P.; BURGOS, J. Lipoxygenase inactivation by manothermosonication: effects of sonication physical parameters, pH, KCl. Sugars, glycerol and enzyme concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.620-625, 1995[a].

28. LÓPEZ, P.; BURGOS, J. Peroxidase stability and reactivation after heat treatment and manothermosonication. **Journal of Food Science**, v.60, p.451-455, 1995[b].

29. LÓPEZ, P.; SALA, F. J.; DE LA FUENTE, J. L.; CONDON, S.; RASO, J.; BURGOS, J. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polypohenol oxidase by manothermosonication. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.252-256, 1994.

30. LUCENA, E. M. P. **Desenvolvimento e maturidade fisiológica de manga 'Tommy Atkins' no Vale do São Francisco**. 2006. 152p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

31. MANAS, P.; PAGAN, R.; RASO, J. Predicting lethal effect of ultrasonic waves under pressure treatments on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 by power measurements. **Journal of Food Science**, v.65, p.663-667, 2000.

32. MASON, T. J. Power ultrasound in food processing d the way forward. In: M. J. W. POVEY; T. J. MASON (Eds.), **Ultrasound in food processing**, London, UK: Thomson Science, 1998, p. 105-126.

33. MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, v.13, p.1091-1101, 1972.

34. NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

35. OBANDA, M.; OWUOR, P. O. Flavonol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.74, p.209-215, 1997.

36. O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial Importance. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.358-367, 2010.

37. PRATT, H. K. Melons. In: HULME, A. C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic, 1971. v.2, p.207-232.

38. RANDALL G. C., ROBERT A. B.; KAREL G. Citrus tissue extracts affects juice cloud stability. **Journal of Food Science**, v.62, p.242-245, 1997.

39. RAO, M. A. **Rheology of Fluid and Semisolid Foods**: principles and applications. New York: Aspen Publishers, 1999. p.433.

40. ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v.66, p.401-436, 1999.

41. ROBINSON, D. S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1991, v.1, p.399-425.

42. ROCHA, A. M. C. N.; MORAIS, A. M. M. B. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' Apple. **Food Control**, v.12, p.85-90, 2001.

43. SAKAKIBARA, M.; WANG, D.; TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.; MORI, S. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.444-448, 1996.

44. SALA, F. J.; BURGOS, J.; CONDÓN, S.; LOPEZ, P.; RASO, J. Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes In: GOULD, G. W (Ed.). **New methods of food preservation**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. cap.9. p.177-204.

45. SHIBATA, H., Y.; KONO, S.; YAMASHITA, Y.; SAWA, H.; OCHIAI; K. TANAKA. Degradation of chlorophyll by nitrogen dioxide generated from nitrite by the peroxidase reaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1230, p.45-50, 1995.

46. SINGH, R. J., S. P. A. GOSS, J. JOSEPH; B. KALYANARAMAN. Nitration of γ-tocopherol and oxidation of α-tocopherol by copper, zinc superoxide dismutase/H_2O_2/NO_2^-: Role of nitrogen dioxide free radical. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.95, p.12912-12917, 1998.

47. SUN, Y.; MA, G.; YE, X.; KAKUDA, Y.; MENG. R. Stability of all-*trans*-β-carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, p.654-661, 2010.

48. SUSLICK, K. S. The chemical effects of ultra-sound. **Scientific American**, v.2, p.80-86, 1989.

49. TEREFE G. M.; VILKHU, K.; SIMONS, L.; MAWSON, R.; VERSTEEG, C. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. **Food Chemistry**, v.117, p.20-27, 2009.

50. TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P.J. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.166-171, 2009.

51. TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P.J. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. **Journal of Food Engineering**, v.93, p.166-171, 2009.

52. VERCET, A.; LOPEZ, P.; BURGOS, J. Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. **Dairy Science**, v.80, p.29-36, 1997.

53. VERCET, A.; SANCHEZ, C.; BURGOS, J.; MONTANES, L.; BUESA, P. L. The effects of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. **Journal of Food Engineering**, v.53, p.273-278, 2002.

54. VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.161-169, 2008.

55. VILLAMIEL, M.; DE JONG, P. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.472-478, 2000.

56. WAN, J.; MAWSON, R.; ASHOKKUMAR, M.; RONACHER, K.; COVENTRY, M. J.; ROGINSKI, H.; VERSTEEG, C. Emerging processing technologies for functional foods. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.60, p.167-169, 2005.

57. WANG, C. Y. Relationship between free radical scavenging enzymes and chilling tolerance in zucchini squash. **Acta Horticulturae**, v.398, p.205-213, 1995.

58. WANG, Z.; MA, Y.; ZHAO, G.; LIAO, X.; CHEN, F.; WU, J.; CHEN, J.; HU, X. Influence of gamma irradiation on enzyme, microorganism, and flavor of *Cantaloupe* (*Cucumis melo* L.) juice. **Journal of Food Science**, v.71, p.215-220, 2006.

59. WISSEMANN, K. W.; LEE, C. Y. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.31, p.206-211, 1980.

60. WU, J., LIN, L. Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: Enzymatic browning and phenolics production. **Biotechnology Progress**, v.18, p.862-866, 2002.

61. WU, J.; GAMAGE, T. V.; VILKHU, K. S.; SIMONS, L. K.; MAWSON, R. Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.186-195, 2008.

62. YEMENICIOGLU, A.; GÜ NAYDIN, N.; CEMEROGLU, B. Cloud stabilization of naturally cloudy apple juices by heat treatments. **Fruit Processing**, v.10, p.23-27, 2000.

63. ZAPATA, J. M.; SABATER, B.; MARTIN, M. Identification of thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone. **Phytochemistry**, v.48, p.1119-1123, 1998.

64. ZHAO, L.; ZHAO, G.; CHEN, F.; WANG, Z.; WU, J.; HU, X. Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-Astaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8346-8351, 2006.

CAPÍTULO 4

Cinética do processo fermentativo de suco de melão por *Lactobacillus casei* NRRL B-442 e influência da estocagem refrigerada nos parâmetros de qualidade da bebida

Cinética do processo fermentativo de suco de melão por *Lactobacillus casei* NRRL B-442 e influência da estocagem refrigerada nos parâmetros de qualidade da bebida

Thatyane V. Fonteles[1]; Mayra G. M. Costa[1]; Ana L. T. de Jesus[1]; Cláudia P. M. L. Fontes[2]; Sueli Rodrigues[1]

[1] Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.
[2] Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a cinética da produção de suco de melão probiótico, além de investigar a influência da estocagem sob refrigeração em parâmetros de qualidade da bebida como: sobrevivência de *L. casei*, pós-acidificação e parâmetros de cor. O suco de melão foi submetido ao processamento ultra-sônico, inoculado com 1% (v/v) da cultura e incubado a 31 ºC/8 horas. Os sucos foram armazenados sob refrigeração a 4°C. Foram determinados pH e parâmetros de cor da bebida, crescimento celular e o número de células viáveis. As análises foram realizadas em intervalos de 7 dias, até o 42º dia de estocagem. A maior contagem celular foi atingida nas 12 horas do estudo, chegando a 9,0 log UFC/mL. Porém a partir da 8ª hora de fermentação não houve um aumento significativo da concentração de células viáveis, motivo pelo qual elegeu-se 8 horas como o tempo de fermentação ideal para a elaboração do suco de melão probiótico. Durante a estocagem refrigerada, houve produção de ácidos e uma discreta redução do número de células viáveis, porém o produto manteve prevalência de células viáveis (com índices acima do preconizado pela legislação brasileira vigente), durante 42 dias de armazenamento a 4°C, independentemente de terem sido estocadas com ou sem açúcar, sem prejuízos à coloração do produto.

Palavras-chave: Viabilidade. pós-acidificação. suco probiótico.

ABSTRACT

The aim of this research was to study the kinetic of the production of probiotic melon juice and investigate the influence of the product storage under refrigeration on the beverage quality parameters such as: survival of L. casei, post-acidification and color. The melon juice was subjected to ultrasonic processing (372.93W/cm^2/10min) and inoculated with 1% (v/v) of L. casei and incubated at 31°C for 8 hours. The juices were stored at 4°C. pH, color parameters, cell biomass and viable cells number were evaluated. Analyses were performed at intervals of 7 days until 42 days of storage. The highest cell count was achieved within 12 hours of study, reaching 9.0 log CFU/mL, but from the 8th of fermentation there was no significant increase in the concentration of viable cells. 8 hours was elected as the optimal fermentation time to prepare the probiotic melon juice. During refrigerated storage there was acid production and a slight reduction in the number of viable cells, but the product kept the viable cells above the level recommended by current Brazilian legislation during 42 days of storage at 4°C, regardless of have been stocked sugar-free or with sugar addition. No damage to the product color was observed.

Keywords: Viability. post-acidification. probiotic juice.

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos probióticos já são ingredientes de sucesso no segmento da alimentação funcional. A popularidade dos alimentos probióticos deve-se aos inúmeros benefícios à saúde atribuídos à sua ingestão que incluem o alívio da constipação intestinal, o alívio dos sintomas da intolerância à lactose (MARTEAU; BOUTRON-RUAULT, 2002); a redução dos níveis de colesterol (PATEL et al., 2009) e o controle de infecções gastrintestinais causados por vírus (COLBÈRE-GARAPIN et al., 2007), parasitas (BAUTISTA-GARFIAS et al., 1999) ou bactérias (SHAH, 2007). Porém a condição fundamental para que sejam observados os efeitos benéficos advindos da ingestão destes micro-organismos é que os mesmos cheguem vivos ao intestino, sobrevivendo às condições adversas de acidez encontradas durante a passagem pelo trato gastrintestinal (LEE et al., 1999).

A sobrevivência de micro-organismos probióticos em produtos alimentícios pode ser afetada por fatores como: pH e pós-acidificação (durante a estocagem refrigerada) em produtos fermentados, produção de peróxido de hidrogênio, oxigênio, temperatura de estocagem e composição do meio (DAVE; SHAH, 1997[a, b]; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997). Shah et al. (2000) demonstraram que bactérias probióticas têm baixa viabilidade em produtos fermentados.

De maneira geral, preconiza-se uma concentração mínima de células viáveis de 10^6-10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro do produto, equivale a uma ingestão diária de 100g ou 100mL de produto contendo 10^8-10^9 UFC para que se obtenha número relevante desses micro-organismos na composição da microbiota intestinal (CRUZ et al., 2009). De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2008) a quantidade mínima viável de micro-organismos probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo.

A fim de investigar a possibilidade do uso de suco de melão sonificado no desenvolvimento de um novo alimento fermentado probiótico, o objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de fermentação de suco de melão sonificado por *L. casei* B-442 além de determinar a sua viabilidade no suco fermentado durante o armazenamento refrigerado e sua influência nas características de qualidade do produto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estudo cinético do processo fermentativo

O suco foi formulado a partir da polpa da fruta congelada (Tropicássia®) sem adição de conservantes, em uma proporção de 1:1 de água e polpa (± 3°Brix) e em seguida, submetido a processamento ultra-sônico em condições otimizadas (372,93 W/cm^2/10 min) (Vide Capítulo 3). Não houve necessidade de ajuste de pH, uma vez que o pH ótimo para a manutenção da viabilidade do micro-organismo é o pH natural do suco de melão utilizado neste estudo (pH 6,16 ± 0,01) (Vide Capítulo 2).

A linhagem de *Lactobacillus casei* B-442 foi ativada em caldo MRS por tempo suficiente para atingir uma concentração de células da ordem de 10^9 UFC/mL, equivalente a 0,600 de absorbância a 590nm na escala de McFarland (MARIANO, 2000). A cultura ativada foi inoculada em 300 mL do suco (1% v/v). A bebida foi fermentada em condições previamente otimizadas de pH (6,1) e temperatura (31°C) (Vide Capítulo 2) durante 12 horas em B.O.D. estática Marconi®, modelo MA415. Foram retiradas amostras a cada duas horas de fermentação para acompanhar a variação do pH, crescimento celular, contagem de células viáveis, consumo de açúcares e produção de ácido lático por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os perfis de crescimento do micro-organismo no suco de melão foram gerados pelo programa OriginPro 8.0.

2.2 Estabilidade físico-química e microbiológica da bebida fermentada

Para o acompanhamento da estabilidade físico-química e microbiológica (viabilidade de *L. casei* B-442), foram preparados 700 mL da bebida fermentada à base de suco de melão conforme descrito na Figura 1. O suco de melão foi inoculado com 1% (v/v) da cultura e incubado a 31ºC durante 8 horas. Os sucos foram imediatamente resfriados, distribuídos em frascos de vidro âmbar, a fim de evitar a degradação de pigmentos carotenóides, e armazenados sob refrigeração a 4ºC. Foram determinados pH e parâmetros de cor da bebida, a biomassa celular e o número de células viáveis. As análises foram realizadas em intervalos de 7 dias, até

o 42º dia de estocagem. Um ensaio controle foi preparado armazenando o suco sonificado não fermentado.

No intuito de avaliar a influência do açúcar na viabilidade do micro-organismo e nas características do suco durante a estocagem refrigerada, foram preparados dois ensaios. No ensaio 1, o suco foi estocado sem açúcar e no ensaio 2, o suco foi adicionado de 10% (p/v) de açúcar (sacarose). Esta concentração foi escolhida baseada em resultados de testes preliminares de aceitação com provadores não treinados.

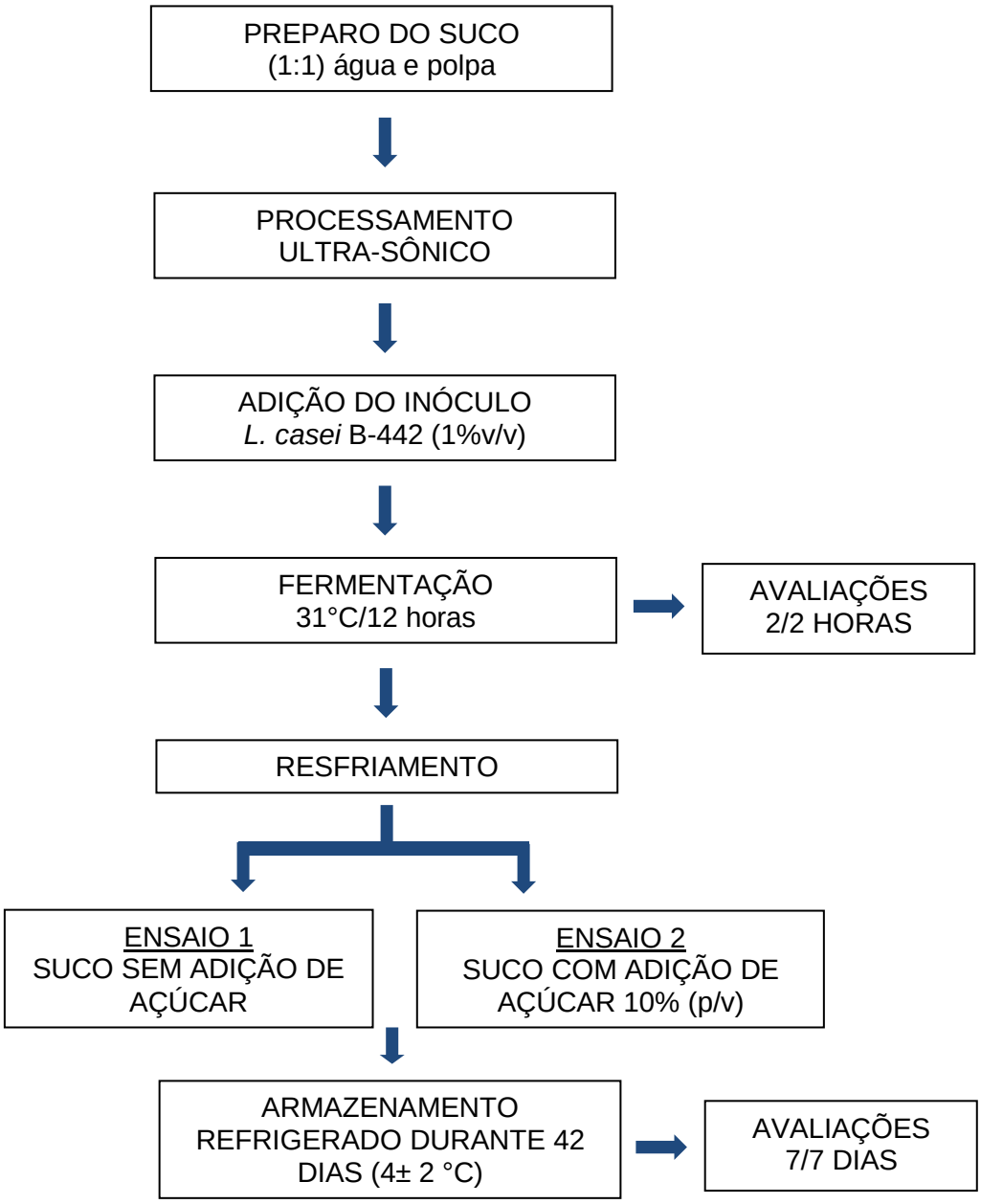


Figura 1: Obtenção do suco de melão probiótico.

2.3 Métodos Analíticos

2.3.1 Determinação instrumental de cor

A cor dos sucos durante o armazenamento refrigerado foi determinada através da medida das coordenadas CIE L*, a* e b*. O equipamento (Minolta® modelo CR300) foi calibrado usando uma placa de referência branca (Y = 94.60, x = 0.3155, y = 0.3321). As coordenadas foram lidas diretamente do aparelho e os parâmetros de diferença de cor (ΔE), croma (C) e tonalidade (*h*°) foram calculados pelas Equações 1, 2, e 3 (FERREIRA, 1991), respectivamente.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2} + \sqrt{(\Delta a^*)^2} + \sqrt{(\Delta b^*)^2} \quad \textbf{(1)}$$

$$C = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \textbf{(2)}$$

$$h° = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad \textbf{(3)}$$

Sendo L* a luminosidade; a* o parâmetro de croma vermelho-verde; b* o parâmetro de croma amarelo-azul. Para cada amostra, foram realizadas cinco leituras.

2.3.2 Determinação do crescimento microbiano

O crescimento do micro-organismo expresso em biomassa seca foi monitorado através da determinação da densidade ótica a 590 nm. A biomassa celular seca foi calculada através de uma curva de calibração da densidade ótica de *L. casei* B-442 em função da massa seca (g/L) (Equação 4) elaborada de acordo com Rodrigues, Lona e Franco (2003).

$$m(g/L) = \frac{ABS\ (590nm - 0{,}00818)}{3{,}395} \quad \textbf{(4)}$$

Onde:

m(g/L) = biomassa em base seca em gramas por litro

Nesta análise, diluiu-se uma alíquota do suco recém inoculado e fermentado em água destilada (1:10) e realizou-se a leitura da absorbância contra um branco com água. As leituras de DO_{590} foram realizadas em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP200UV. A diferença entre as absorbâncias inicial e final correspondeu ao crescimento do micro-organismo durante a estocagem refrigerada.

2.3.3 Contagem de células viáveis de *L. casei* no suco fermentado

Para a análise da viabilidade de *L. casei* no suco fermentado, as amostras foram diluídas seriadamente em água peptonada (Himedia) estéril e semeadas pelo método '*spread plate*' em placas de ágar MRS (Himedia). As placas foram incubadas a 37°C durante 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias de *L. casei*. Os resultados foram expressos em logaritmo de unidades formadoras de colônias (log UFC/ mL).

2.3.4 Determinação do pH

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro Marconi®, modelo PA200, calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme metodologia da AOAC (2010).

2.3.5 Quantificação de açúcares e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ácidos orgânicos e os açúcares do suco fermentado foram identificados e quantificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) modelo *Prostar* 210, utilizando um detectores de índice de refração (IR) *Prostar* 355 e ultra-violeta/visível *Prostar* 345, ambos da marca Varian®. As condições de operação estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de operação do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

	Açúcares	**Ácidos orgânicos**
Coluna	BIO-RAD HPX-87C	BIO-RAD HPX-87H
Dimensões da coluna	300mm x 7,8mm	300mm x 7,8mm
Fase móvel	Água *Milli*Q	H_2SO_4 0,01N
Temperatura	85°C	50°C
Vazão da fase móvel	0,6 mL/min	0,6 mL/min
Pressão da bomba	14 bar	50 bar
Volume injetado	20µL	20µL
Detector	Índice de refração (35°C)	UV-VIS 210nm

As amostras analisadas foram centrifugadas (9.676 x g/ 10min, a 25ºC), diluídas em água ultra pura e submetidas a extração em fase sólida, usando um cartucho C18 (Bond Elut C18), a fim de remover substâncias coloridas, que podem interferir na determinação do analito de interesse. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (Whatman®) com poros de 0,45 µm.

Tabela 2: Constituintes e respectivos tempos de retenção do padrão utilizado nas análises cromatográficas

Componentes	**Tempo de retenção (min.)**
Sacarose	9
Glucose	10
Frutose	13
Ácido lático	14

Utilizou-se como padrão uma mistura de soluções puras de concentrações conhecidas (Sigma®) (faixa de 0,4 a 8 g/L para os açúcares e 0,2 a 8 g/L para ácido lático) dos constituintes apresentados na Tabela 2, que mostra também os tempos de retenção de cada componente.

2.4 Cálculo do valor calórico do suco de melão probiótico

Foram determinadas as quantidades de açúcares, proteínas e lipídios (carotenóides totais) presentes no suco de melão fermentado para o cálculo do valor calórico da bebida, preparada conforme o fluxograma contido na Figura 1.

Os açúcares (sacarose, glucose e frutose) foram quantificados por CLAE, utilizando o equipamento e as condições de operação descritas no item 2.3.5; as proteínas pelo método de Bradford (1976) e lipídios (carotenóides totais) pelo método de Higby (1962), utilizando solução extratora de álcool isopropílico: hexano (3:1) sendo as leituras espectrofotométricas realizadas a 450 nm e os resultados expressos em mg/100mL de suco. Foram utilizados fatores de conversão de Atwater para o cálculo do valor energético das bebidas sendo fator 4 para carboidratos e proteínas e 9 para lipídios, de acordo com o indicado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo cinético do processo fermentativo

O micro-organismo probiótico em estudo foi capaz de fermentar o suco de melão sonificado com crescimento e viabilidade satisfatórios utilizando os açúcares presentes naturalmente no suco, sem a necessidade de adição de sacarose ou de quaisquer outros nutrientes. O crescimento do micro-organismo iniciou-se logo após a inoculação mostrando que não houve fase de adaptação (fase lag) de *L. casei* no suco de melão sonificado (Figura 2).

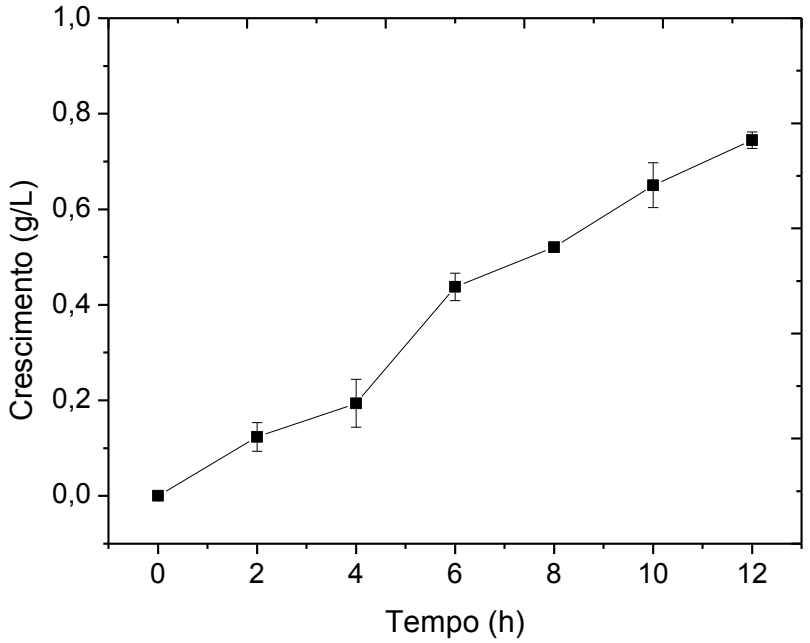


Figura 2: Perfil de crescimento de *L. casei* em suco de melão sonificado.

Considerando a contagem de células viáveis de *L. casei*, verificou-se um aumento de 1 ciclo logarítmico em 4 horas de incubação a 31 ºC. Neste intervalo de tempo, o número médio de células viáveis variou de 7,10 a 8,17 log UFC/mL (Figura 3). A maior contagem celular foi atingida nas 12 horas do estudo, chegando a 9,0 log UFC/mL, porém a partir de 8ª hora de fermentação não houve um aumento significativo da concentração de células viáveis, motivo pelo qual elegeu-se 8 horas como o tempo de fermentação ideal para a elaboração do suco de melão probiótico.

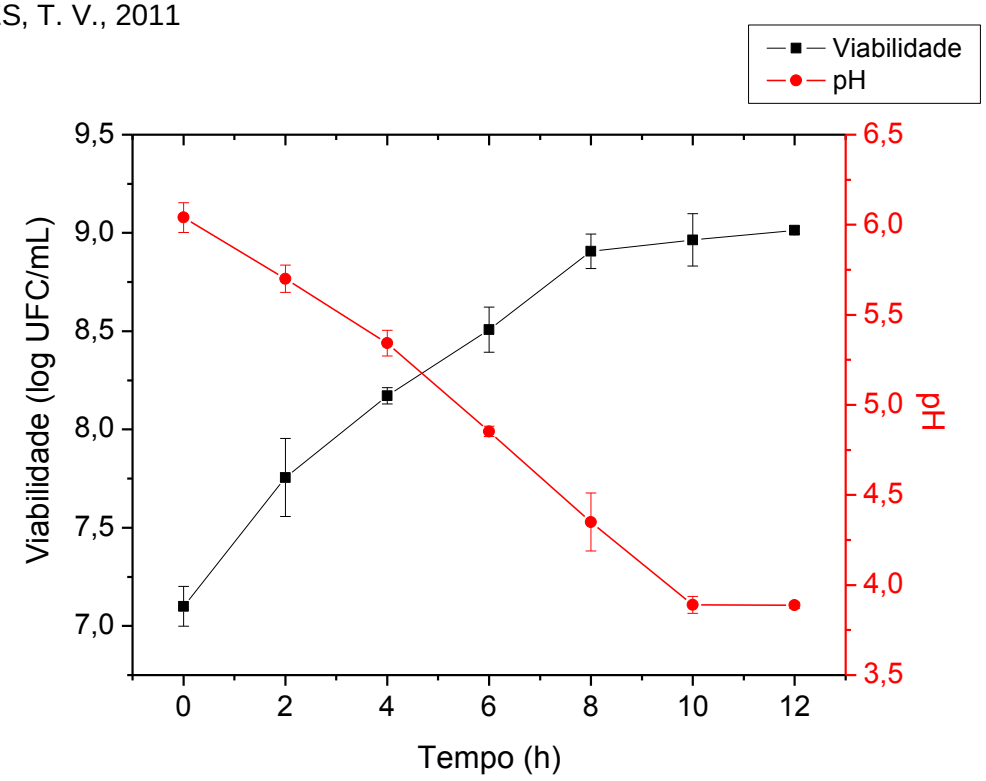


Figura 3: Contagem de células viáveis de *L. casei* B-442 em suco de melão sonificado.

Pesquisas revelaram que o tipo de substrato afeta os parâmetros de crescimento dos micro-organismos. Utilizando a mesma linhagem deste trabalho, Costa et al. (2010) e Pereira, Maciel e Rodrigues (2011) reportaram tempos de fermentação de 12 e 16 horas nos sucos de abacaxi e caju, respectivamente, para atingir concentração de células viáveis e acidez adequadas para que o produto seja considerado probiótico e seguro do ponto de vista microbiológico. Neves (2005) observou que foram necessárias 10 horas de fermentação para obter um produto fermentado probiótico de maçã, com contagem de células viáveis de *L. casei* de 8,4 log UFC/mL, com pH final 4,0.

A Figura 4 revela que ao longo da fermentação, o micro-organismo consumiu parcialmente os açúcares naturalmente presentes no suco de melão para produção de ácido lático. A sacarose foi o açúcar utilizado preferencialmente por *L. casei* B-442 que consumiu cerca de 50% do açúcar nas duas primeiras horas de fermentação. A glucose e a frutose praticamente não foram utilizadas durante a fermentação. Um aumento da concentração destes açúcares pode ser associado ao processo de inversão da sacarose devido à acidificação do meio.

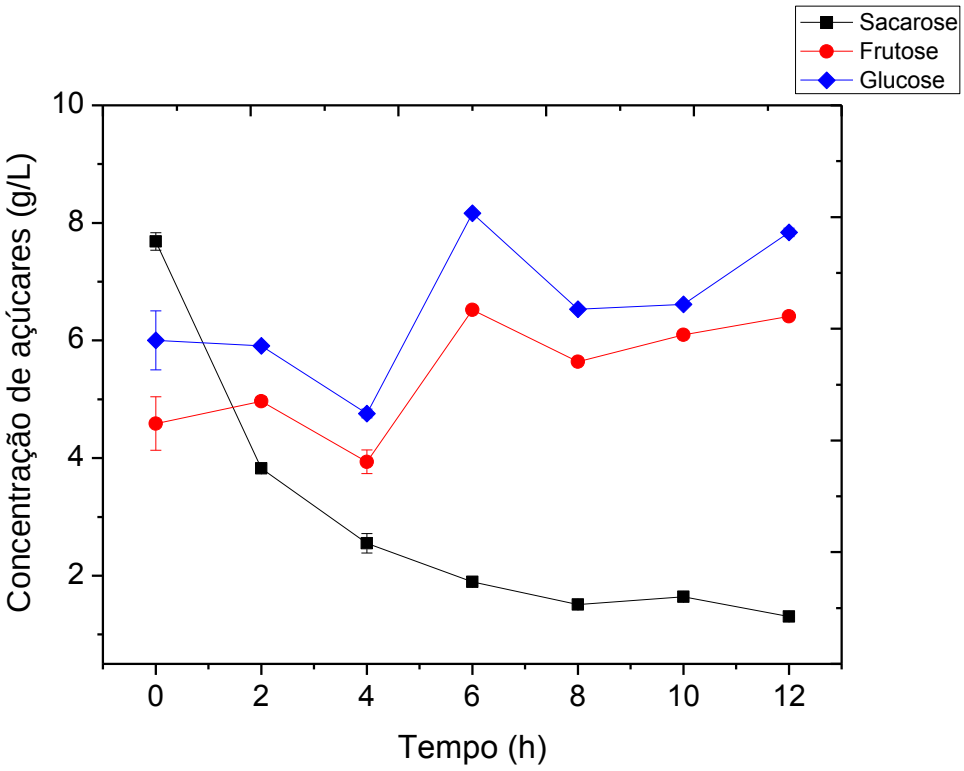


Figura 4: Consumo de açúcares do suco de melão por *L. casei* B-442 ao longo da fermentação.

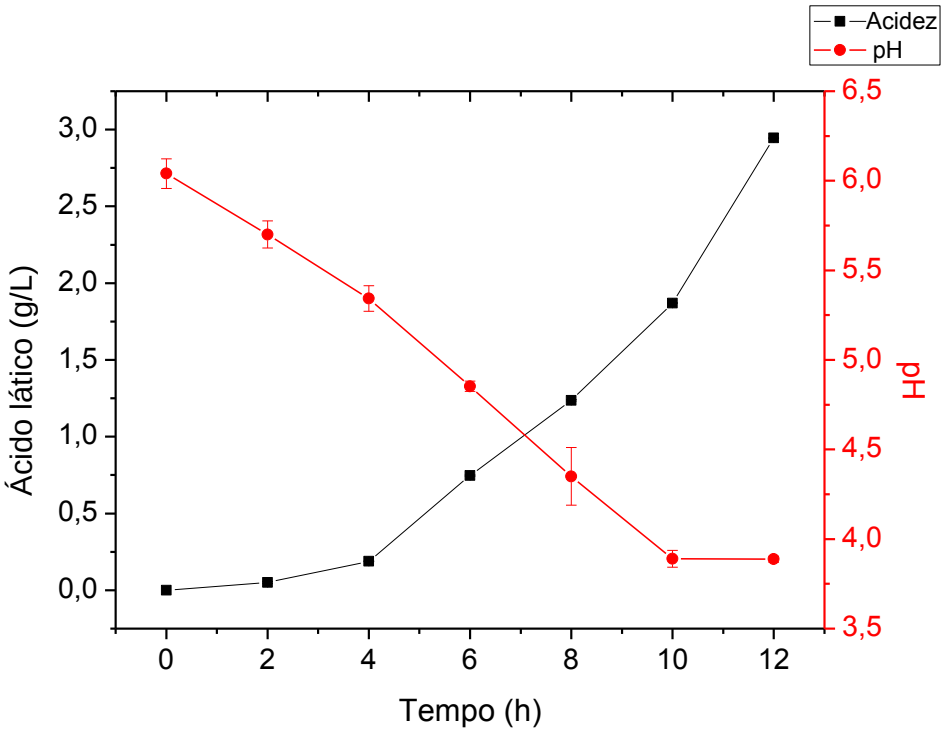


Figura 5: Produção de ácido lático por *L. casei* B-442 ao longo da fermentação.

Neste trabalho, foi observado um declínio constante no pH durante todo o período de fermentação atingindo o valor de 3,88 ± 0,01 em 12 horas (Figura 5). Verificou-se que a partir de 8ª hora de fermentação o pH do suco foi reduzido a próximo de 4,5 (acidez = 1,23 ± 0,01 g/L), valor apropriado para evitar prejuízos ao sabor e garantir a estabilidade microbiológica da bebida. Enquanto isso, Østlie, Helland e Narvhus (2003) reportaram pH de 3,9-4,1 após um tempo mais longo de fermentação (24 horas) de leite por *L. rhamnosus* GG. O tempo reduzido de fermentação de suco de melão representa uma vantagem tecnológica uma vez que reduz o risco de contaminação do produto e deterioração de seus constituintes nutricionais.

Além da segurança microbiológica e da qualidade sensorial o pH pode influenciar a viabilidade de micro-organismos probióticos. Shah (2000), atribui o declínio do pH do meio devido o acúmulo de ácidos orgânicos decorrentes da fermentação como a principal causa de perda de viabilidade de probióticos.

Dave e Shah (1997[b]) afirmam que a viabilidade de micro-organismos probióticos durante a estocagem de produtos alimentícios dependerá dentre outros fatores da disponibilidade de nutrientes, promotores de crescimento e/ou inibidores, da concentração de solutos, da concentração inicial do inóculo, da temperatura de incubação, do tempo de fermentação e da temperatura de estocagem.

Foi determinado que o tempo ideal de fermentação encontra-se na fase logarítmica, ou seja, durante o crescimento e antes de chegar à fase estacionária, pois, se a fermentação for cessada neste momento, os micro-organismos ainda possuem nutrientes suficientes para sua manutenção durante a estocagem refrigerada.

3.2 Influência da estocagem refrigerada na estabilidade da bebida fermentada

3.2.1 Sobrevivência de *L. casei* B-442

Sob a ótica dos efeitos benéficos à saúde advindos do consumo de probióticos, é fundamental que os micro-organismos mantenham sua funcionalidade e viabilidade durante “vida de prateleira” do produto (SHEEHAN, ROSS,

FITZGERALD, 2007). As células viáveis do(s) probiótico(s) devem estar presentes em concentrações mínimas exigidas até o momento de consumo. As mudanças observadas na contagem de células viáveis durante o armazenamento refrigerado do suco fermentado são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 3: Efeito da estocagem refrigerada na viabilidade de *L. casei* B-442 em suco de melão fermentado(1)

Estocagem (dias)	*Viabilidade (log UFC/mL)*	
	Suco sem açúcar	Suco com açúcar
0	8,90 ± 0,02	8,90 ± 0,02
7	8,47 ± 0,04	8,20 ± 0,05
14	8,20 ± 0,03	7,97 ± 0,05
21	8,39 ± 0,01	8,14 ± 0,06
28	8,43 ± 0,05	8,13 ± 0,01
35	8,41 ± 0,02	8,40 ± 0,04
42	8,79 ± 0,04	8,69 ± 0,11

(1) Valores são: média ± desvio padrão (n=3).

Os resultados mostraram uma discreta redução da população de *L. casei* no suco de melão fermentado sem adição de açúcar atingindo cerca de 8% de redução na 2ª semana de estocagem. Esse comportamento corresponde à fase de adaptação do micro-organismo à condição adversa a que foi exposto (temperatura de refrigeração). A partir da 3ª semana, houve um aumento do número de células viáveis alcançando 8,79 log UFC/mL ao final de 42 dias de estocagem.

Comportamento semelhante foi observado para o suco fermentado adicionado de açúcar. Porém, nesse caso a redução observada foi mais acentuada atingindo aproximadamente um ciclo logarítmico (≈10%) durante 14 dias de estocagem. A contagem de células viáveis atingiu 8,69 log UFC/mL em 42 dias de estocagem refrigerada.

O micro-organismo continuou metabolizando os açúcares durante a estocagem refrigerada para manutenção da viabilidade celular e síntese de ácido lático (Figura 6). Ao longo dos 42 dias de estocagem foram consumidos 85,27%,

29,42%, 28,22% de sacarose, glucose e frutose, respectivamente, no suco sem adição de açúcar (Figura 6a).

A Figura 6 mostra que para ambos os sucos, com ou sem adição de açúcar, o micro-organismo consumiu preferencialmente a sacarose utilizando a glucose e a frutose como substrato apenas na escassez de sacarose. Coelho (2009) desenvolveu um suco de laranja fermentado por *L. casei* B-442 e também verificou um maior consumo da sacarose e frutose pelo micro-organismo em relação à glucose.

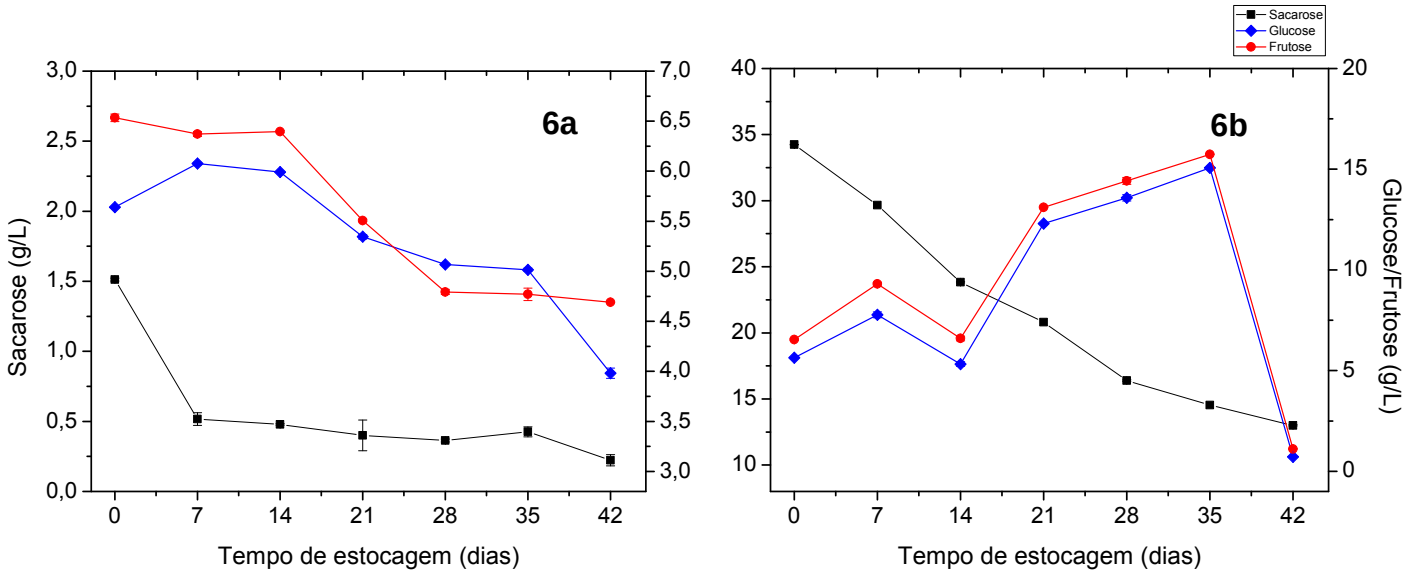


Figura 6: Consumo de açúcares durante a estocagem refrigerada do suco de melão fermentado por *L. casei* B-442 sem adição de açúcar (6a) e com açúcar (6b).

Pesquisas têm revelado que o metabolismo de carboidratos por bactérias do gênero *Lactobacillus* varia de acordo com a espécie e depende do tipo de substrato e do tempo de fermentação (MOUSAVI et al., 2010; NANCIB; NANCIB; BOUDRANT, 2009; YOON et al., 2004).

A Figura 7 revela o comportamento de *L. casei* no suco de melão com e sem adição de açúcar. É possível observar que a adição de açúcar influenciou negativamente a sobrevivência do micro-organismo.

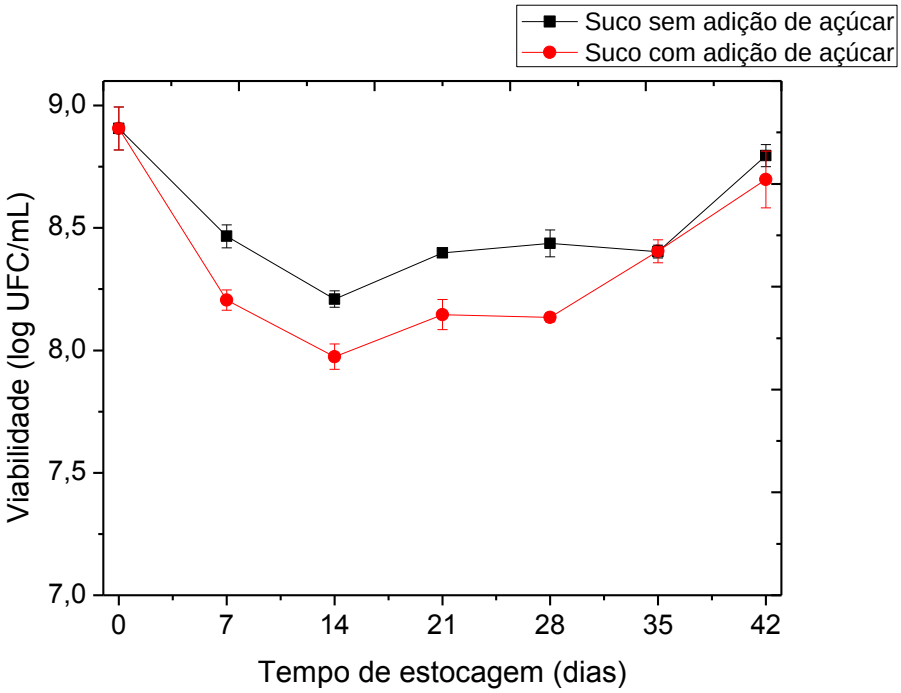


Figura 7: Comparação do número de células viáveis dos sucos com e sem adição de açúcar.

A adição de açúcar altera o equilíbrio osmótico do meio afetando o metabolismo microbiano. Porém, os micro-organismos exibem mecanismos de manutenção da homeostase [1] que permitem que os mesmos permaneçam viáveis. No caso do estresse ocasionado por desequilíbrio osmótico, o metabolismo bacteriano é induzido a produzir proteínas de estresse e acumular solutos compatíveis tais como betaína e trealose (PRASAD; McJARROW; GOPAL, 2003).

Apesar da redução do número de células viáveis observada, o produto manteve prevalência de células viáveis (com índices acima do preconizado pela legislação vigente), durante 42 dias de armazenamento a 4°C, independentemente de terem sido estocadas com ou sem açúcar. Alguns autores sugerem que os produtos fermentados, no momento do consumo, devem conter no mínimo 6 log UFC/mL células probióticas viáveis, devido à dose mínima terapêutica diária ser de

[1] Propriedade de regular o ambiente interno para manter uma condição estável, mediante múltiplos ajustes de equilíbrio dinâmico controlados por mecanismos de regulação interrelacionados (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

10^8-10^9 células viáveis em 100 gramas do produto fermentado (GOMES; MALCATA, 1999).

Os resultados alcançados neste estudo foram mais satisfatórios que os obtidos por Mousavi et al. (2010) no desenvolvimento de suco de romã probiótico. Os autores relataram a redução de três ciclos logarítmicos nas contagens de *L. plantarum* e *L. delbruekii* após 14 dias de estocagem a 4°C.

Comparando a viabilidade de linhagens probióticas de *Lactobacillus* empregadas em produtos lácteos é possível concluir que as taxas de sobrevivência reportadas neste estudo são maiores. Vinderola, Bailo e Reinheimer (2000) relataram uma redução de 4,6 e 4,2 ciclos logarítmicos de *L. acidophilus* em iogurtes integral e desnatado, respectivamente, após quatro semanas de estocagem a 5°C.

Gomes e Malcata (1999) destacaram a limitação tecnológica que o leite apresenta como meio de cultura para o desenvolvimento de bactérias probióticas. Apesar de ser o principal substrato para a propagação de culturas probióticas, algumas bactérias do grupo *Lactobacillus* são incapazes de se desenvolver no leite sem suplementação uma vez que este é um meio que possui poucos aminoácidos livres em sua composição (ELLI et al., 1999).

3.2.2 Pós-acidificação

O ácido lático é o principal produto do metabolismo das bactérias láticas (cerca de 70 a 90% dos compostos gerados) e é sintetizado durante todo o processo de fermentação da lactose (FERREIRA, 2003). A produção de ácido lático proporciona, em alimentos fermentados, o seu sabor ácido característico, podendo também acentuar o aroma do produto. Durante a estocagem refrigerada dos produtos fermentados, pode haver aumento da acidez titulável. Estas mudanças na acidez estão relacionadas com vários fatores, por exemplo: temperatura de refrigeração, tempo de armazenamento e poder de pós-acidificação das culturas utilizadas (GURGEL; OLIVEIRA, 1995 *apud* MACEDO et al., 2008).

Denomina-se “pós-acidificação” o mecanismo de produção de ácido lático durante o armazenamento refrigerado (OLIVEIRA et al., 2002). Segundo Dave e Shah (1997[a,b]) esse fenômeno reconhecidamente afeta a viabilidade de bactérias probióticas.

As Figuras 8a e 8b apresentam os perfis de pós-acidificação durante o armazenamento refrigerado do suco fermentado sem adição de açúcar e com adição de açúcar, respectivamente.

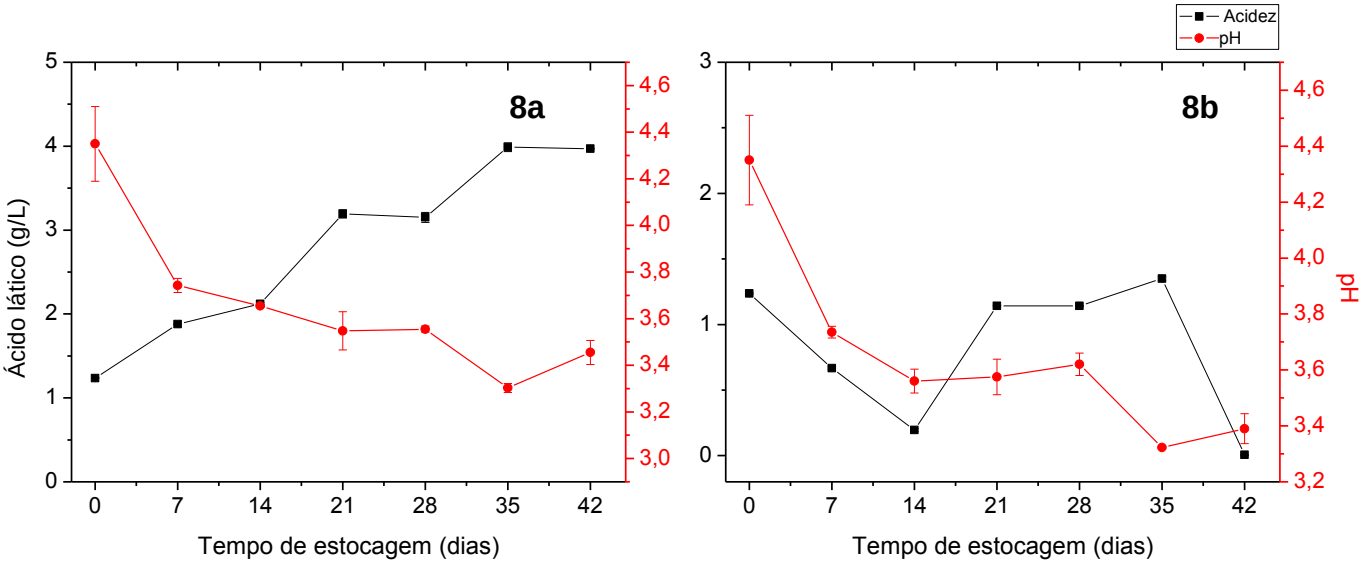


Figura 8: Produção de ácido lático (g/L) durante a estocagem refrigerada de suco de melão fermentado por *L. casei* B-442 sem adição de açúcar (8a) e com açúcar (8b).

Os resultados revelam que o micro-organismo *L. casei* B-442 tem boa capacidade de acidificação mesmo em temperaturas de refrigeração. O pH do suco de melão sem açúcar passou de 4,35 a 3,45 enquanto o suco adoçado passou do pH 4,37 a 3,39 ao final de 42 dias de estocagem refrigerada.

De forma semelhante, Guo et al. (2009) verificaram a boa capacidade de pós-acidificação de *L. casei* em leite. Após 28 dias de estocagem refrigerada do leite fermentado, o pH passou de 5,59 a 4,60.

As Figuras 9a e 9b apresentam os perfis da contagem de células viáveis durante o armazenamento refrigerado do suco fermentado sem adição de açúcar e com adição de açúcar, respectivamente.

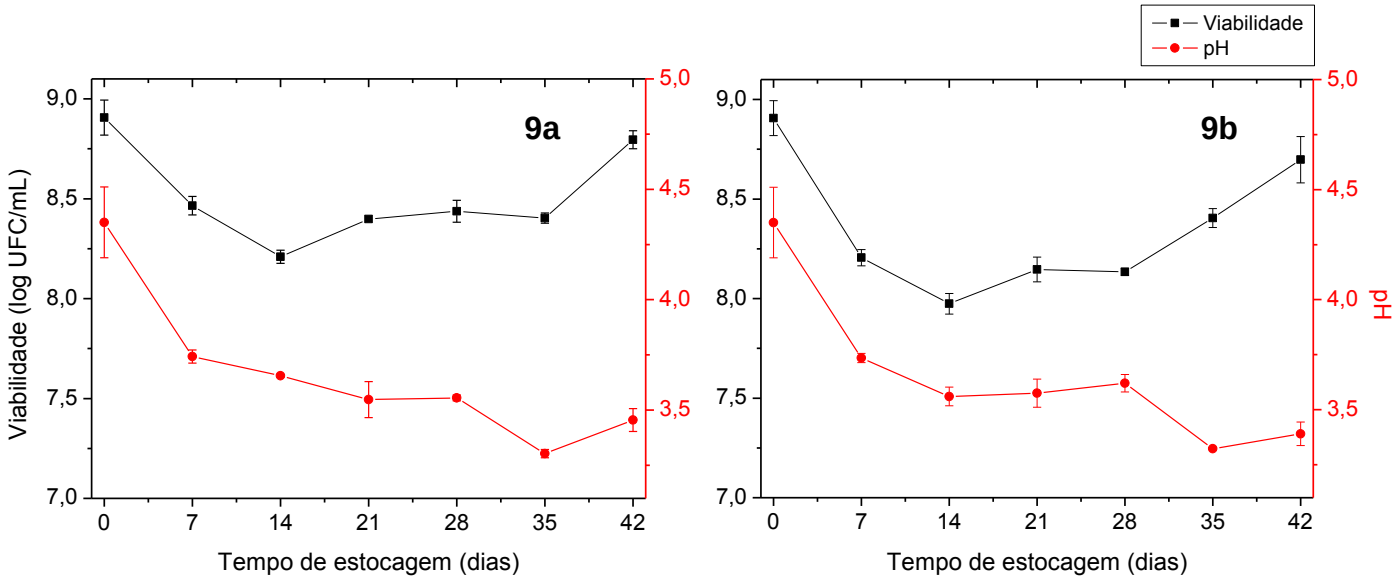


Figura 9: Contagem de células viáveis e pós-acidificação de *L. casei* B-442 ao longo da estocagem refrigerada do suco de melão sem adição de açúcar (9a) e com açúcar (9b).

Ao longo do período de estocagem, o pH dos sucos foi diminuindo, mostrando boa capacidade de pós-acidificação do micro-organismo, no entanto, sem efeitos inibitórios para a viabilidade celular. Esta tendência foi observada para os sucos com e sem adição de açúcar (Figura 9). Sendo assim, esses resultados confirmam a capacidade de adaptação em meios ácidos da linhagem *L. casei* NRRL B-442, característica tecnológica desejável em culturas probióticas, já que manteve população de 8,79 e 8,69 log UFC/mL nos sucos sem e com adição de açúcar, respectivamente, durante os 42 dias de estudo (Tabela 3).

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram aqueles relatados por Macedo et al. (2008) que verificaram uma boa capacidade de pós-acidificação de linhagens do gênero *L. casei*.

3.2.3 Avaliação da cor

A luminosidade (L*) do suco fermentado variou significativamente em relação ao controle nos sucos com e sem adição de açúcar ao longo da armazenagem refrigerada. O comportamento dos valores de L* e as equações ajustadas podem ser observados na Figura 10.

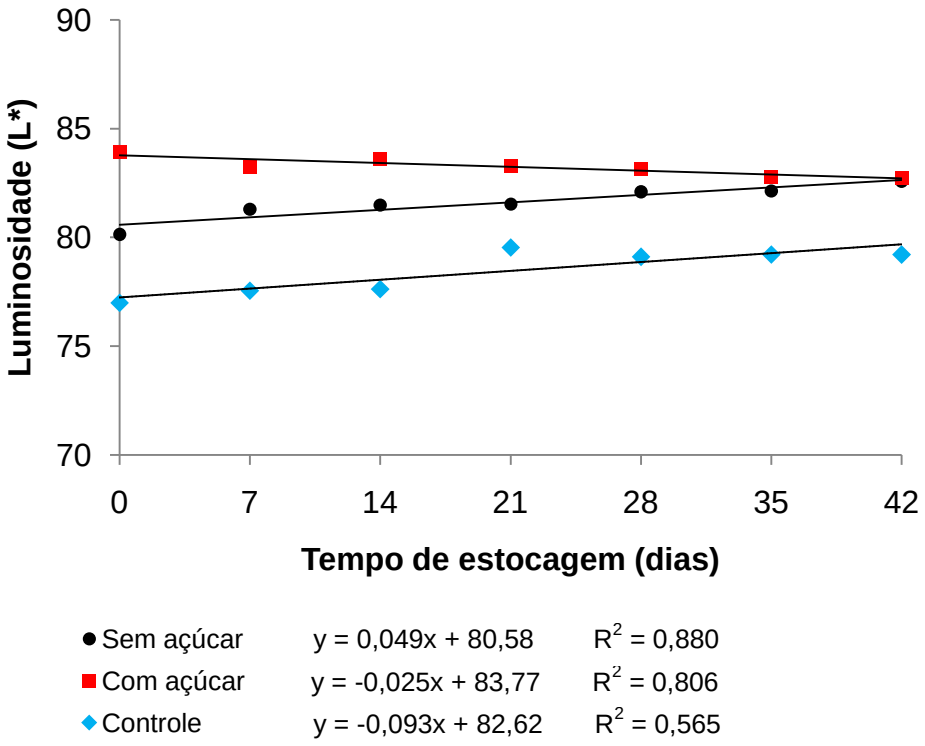


Figura 10: Valores de luminosidade de suco de melão fermentado e armazenado sem açúcar (●), com açúcar (■) e controle (◆) durante estocagem refrigerada.

Houve um aumento na luminosidade dos sucos comparados ao controle que pode ser atribuído ao crescimento do micro-organismo e liberação de metabólitos que consequentemente, torna o suco mais branco. Coelho (2009) observou comportamento semelhante durante a estocagem refrigerada de suco de laranja fermentado por *L. casei* B-442.

Ocorreram variações significativas ($p<0,05$) nos parâmetros a* e b* durante o armazenamento que podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4: Influência da estocagem refrigerada na cor do suco melão fermentado probiótico com e sem adição de açúcar [(1)]

Estocagem (dias)	L*	a*	b*	°*h*	Croma	ΔE
SUCO SEM ADIÇÃO DE AÇÚCAR						
0	80,14 ± 0,40^{a}	4,90 ± 0,23^{f}	19,68 ± 0,62^{i,j}	76,02 ± 0,22^{d}	20,28 ± 0,66^{h,i}	1,49 ± 0,11^{a}
7	81,31 ± 0,23^{b,c,d,e}	4,01 ± 0,12^{c,d}	16,14 ± 0,34^{d,e}	76,03 ± 0,20^{e,f,g}	17,84 ± 0,33^{d}	6,43 ± 0,43^{e,f}
14	81,50 ± 0,23^{b,c}	4,28 ± 0,10^{e}	17,33 ± 0,29^{f,g,h}	76,11 ± 0,13^{d}	16,08 ± 0,31^{e,f,g}	4,57 ± 0,79^{c,d}
21	81,54 ± 0,25^{b}	3,58 ± 0,17^{c,d}	15,68 ± 0.50^{d,e}	77,15 ± 0,21^{e}	16,63 ± 0,52^{d}	6,64 ± 0,27^{e,f}
28	82,10 ± 0,33^{b}	3,55 ± 0,17^{d,e}	15,16 ± 0,59^{e,f,g}	76,82 ± 0,10^{d}	15,57 ± 0,62^{e}	5,55 ± 0,24^{d,e}
35	82,13 ± 0,67^{b,c,d,e}	3,59 ± 0,31^{c,d}	15,28 ± 0,12^{d,e}	76,80 ± 0,18^{e}	15,69 ± 0,16^{d}	6,74 ± 0,51^{e,f,g}
42	82,58 ± 0,19^{c,d,e,f}	3,42 ± 0,11^{c}	14,58 ± 0,40^{c,d,e}	76,80 ± 0,10^{e}	14,97 ± 0,41^{c,d}	7,58 ± 0,41^{f,g,h}
SUCO COM ADIÇÃO DE AÇÚCAR						
0	82,93 ± 0,18^{f}	3,45 ± 0,08^{c}	15,71 ± 0,36^{d,e,f}	77,61 ± 0,06^{h}	16,08 ± 0,37^{d}	6,83 ± 0,47^{e,f,g}
7	83,24 ± 0,30^{f}	3,34 ± 0,10^{c}	15,05 ± 0,64^{d,e}	77,47 ± 0,18^{g,h}	15,42 ± 0,64^{c,d}	7,54 ± 1,40^{f,g,h}
14	83,61 ± 0,16^{f}	3,22 ± 0,08^{c}	14,29 ± 0,28^{c,d}	77,30 ± 0,06^{f,g,h}	14,65 ± 0,29^{c,d}	8,36 ± 0,53^{h}
21	83,28 ± 0,04^{f}	2,72 ± 0,05^{a,b}	12,16 ± 0,17^{a,b}	77,37 ± 0,06^{e,f,g,h}	13,74 ± 0,17^{a,b}	10,15 ± 0,67^{i,j}
28	83,12 ± 0,67^{e,f}	3,10 ± 0,47^{b,c}	13,39 ± 1,53^{b,c}	77,02 ± 0,46^{f}	14,69 ± 1,03^{b,c}	8,77 ± 1,05^{h,i}
35	82,76 ± 0,19^{e,f}	2,68 ± 0,19^{a}	11,86 ± 1,79^{a,b}	77,34 ± 0,09^{f,g,h}	12,46 ± 1,02^{a,b}	10,39 ± 1,78^{j}
42	82,75 ± 0,20^{e,f}	3,20 ± 0,11^{a,b,c}	14,13 ± 0,37^{c,d}	77,23 ± 0,11^{e,f,g,h}	12,16 ± 0,39^{c,d}	8,11 ± 0,43^{g,h}
CONTROLE						
0	77,40 ± 0,46^{a,e}	2,93 ± 0,31^{f}	11,10 ± 0,65^{j}	75,22 ± 0,30^{b}	21,77 ± 0,62^{i}	---
7	77,56 ± 0,64^{b,c,d}	2,99 ± 0,04^{c,d}	11,13 ± 0,31^{a}	74,95 ± 0,31^{c}	18,51 ± 0,31^{a}	10,33 ± 0,37^{j}
14	77,63 ± 1,42^{d,e,f}	3,05 ± 0,10^{e}	11,26 ± 0,34^{a}	74,84 ± 0,07^{c}	19,52 ± 0,36^{a}	10,28 ± 0,24^{j}
21	79,54 ± 0,18^{f}	6,18 ± 0,12^{c,d}	20,86 ± 0,39^{a}	73,53 ± 0,10^{c}	19,28 ± 0,41^{a}	10,43 ± 0,39^{j}
28	79,11± 0,19^{a}	5,54 ± 0,12^{d,e}	17,66 ± 0,27^{g,h}	72,58 ± 0,13^{a}	11,48 ± 0,29^{g}	3,30 ± 0,38^{c}
35	79,22 ± 0,09^{a}	5,54 ± 0,12^{c,d}	18,48 ± 0,46^{h,i}	73,30 ± 0,11^{b}	11,52 ± 0,47^{g,h}	3,34 ± 0,23^{a,b}
42	79,21 ± 0,32^{a}	5,54 ± 0,18^{c}	18,47 ± 0,78^{h,i}	73,25 ± 0,13^{b}	11,66 ± 0,49^{g,h}	3,42 ± 0,24^{a,b}

(1) Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; L* (luminosidade); a* (croma verde-vermelho); b* (croma azul-amarelo); *h*° (tonalidade); Croma (cromaticidade) e ΔE (variação total de cor). Valores são: média ± desvio padrão (n=5).

Os valores de a* nos sucos fermentados (com e sem açúcar) apresentaram ligeira queda, porém mantendo valores positivos, indicando que os produtos mantiveram a cor característica do fruto (amarelo-alaranjado) durante todo o tempo de armazenamento.

A Figura 11 mostra o comportamento do ângulo de tonalidade e as equações ajustadas com os dados experimentais em função do tempo de armazenamento.

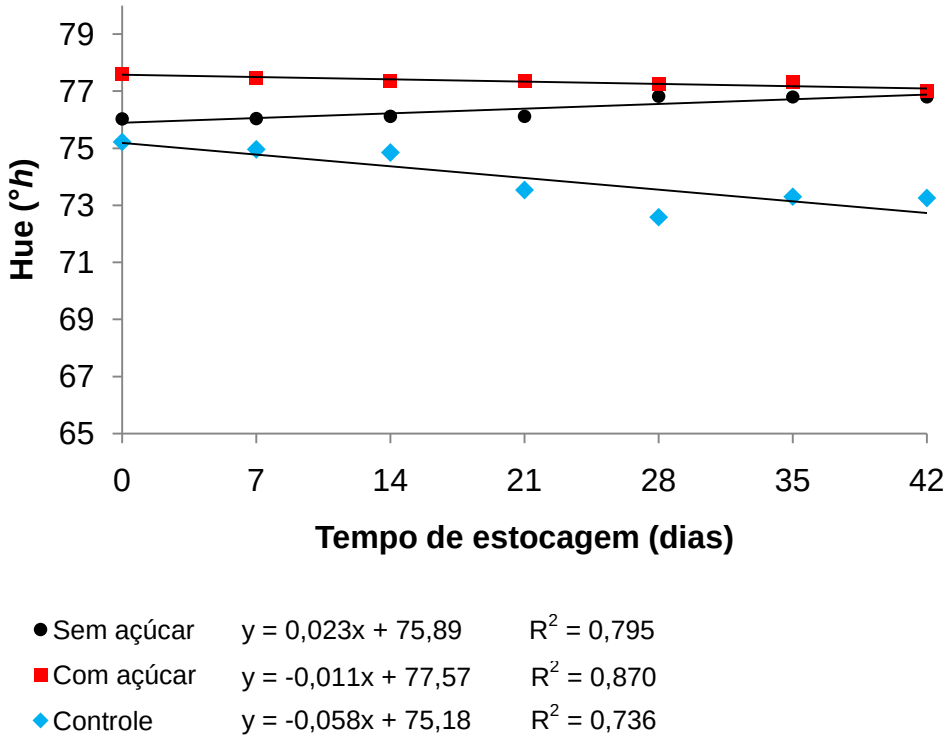
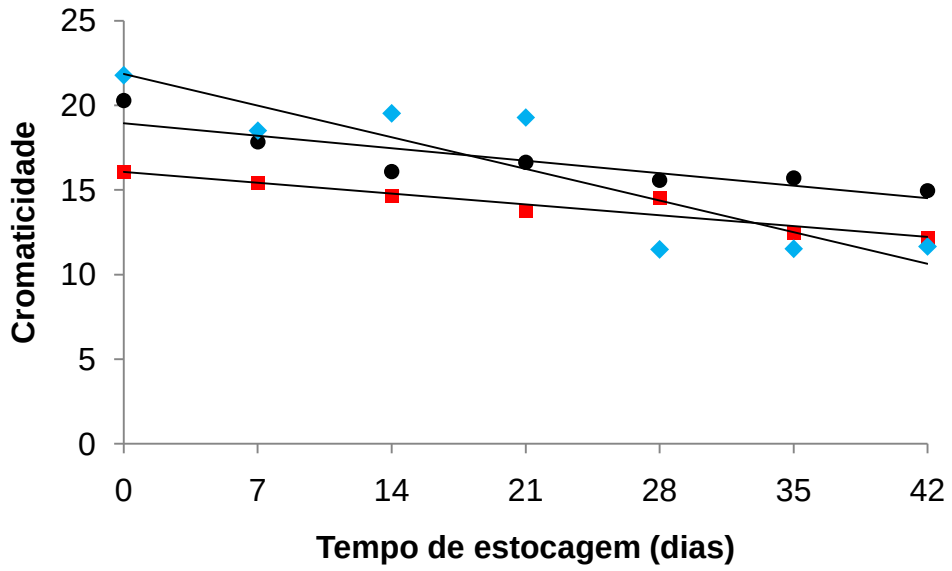


Figura 11: Ângulo de tonalidade de suco de melão fermentado e armazenado sem açúcar (●), com açúcar (■) e controle (◆) durante estocagem refrigerada.

Pequenas alterações no ângulo de tonalidade foram observadas para ambos os sucos, porém menos acentuadas em comparação com o controle. O ângulo de tonalidade observado para os sucos fermentados foi em média 75°, que representa a cor característica do melão *Cantaloupe*. Este valor está entre o ângulo 0° (tonalidade vermelha) e o ângulo de 90° (tonalidade amarela) (CHAUCA, 2000 *apud* BASTOS, 2004).

A Figura 12 apresenta os valores de croma e as equações ajustadas aos dados experimentais.



● Sem açúcar	y = -0,105x + 18,95	R^2 = 0,776
■ Com açúcar	y = -0,091x + 16,05	R^2 = 0,896
◆ Controle	y = -0,267x + 21,85	R^2 = 0,804

Figura 12: Valores de cromaticidade de suco de melão fermentado e armazenado sem açúcar (●), com açúcar (■) e controle (◆) durante estocagem refrigerada.

Uma tendência de queda foi observada para valores de croma dos sucos fermentados e do controle em função do tempo de armazenamento (cor amarela menos acentuada, o que, segundo Bastos (2004), é um sinal de descoloração que pode ser atribuído à ruptura de tecidos e parede celular, ou ainda pode ser indicativo de degradação de pigmentos. No caso deste estudo, este declínio pode ser atribuído ao crescimento do micro-organismo.

As variações nos parâmetros de cor observadas para os sucos fermentados podem ser visualmente perceptíveis uma vez que os valores de ΔE encontrados superaram o valor limite de percepção à visão humana ($\Delta E < 2,0$). Segundo Coelho (2009), tais alterações podem ser atribuídas ao grande número de células viáveis de *L. casei*, pois além da sua biomassa, seus produtos metabólicos podem ter alterado a coloração do produto.

3.3 Valor calórico do suco de melão probiótico

A Tabela 5 apresenta o balanço energético para o cálculo do valor calórico do suco de melão probiótico após 8 horas de fermentação. Os resultados mostraram que a bebida desenvolvida possui baixo valor calórico inclusive quando adicionada de açúcar.

Tabela 5: Balanço energético para o cálculo do valor calórico do suco de melão probiótico

Componentes	**Concentração (g/100mL)**		
	CONTROLE	SEM AÇÚCAR	COM AÇÚCAR
Carboidratos	2,21	1,36	4,67
Proteínas	$5,3 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$
Lipídios	1,59	1,57	1,30
Valor calórico (kcal/100mL)	23,15	19,57	30,38

A bebida probiótica desenvolvida neste trabalho pode ser considerada de baixa caloria uma vez que o seu valor calórico está bem abaixo do valor médio encontrado para bebidas lácteas probióticas desnatadas (Tabela 6).

Tabela 6: Valor calórico de bebidas lácteas probióticas disponíveis no mercado

Produto	**Marca**	**Valor calórico (kcal/100g)**
Leite fermentado Batavo	Batavo	74
Leite fermentado Actimel (parcialmente desnatado)	Danone	80
Leite fermentado Activia (parcialmente desnatado)	Danone	84
Leite fermentado Yakult	Yakult	74
Leite fermentado Chamyto	Nestlé	55
	Média	73,4 ± 11,12

Fonte: Site dos fabricantes na internet.

A Figura 13 mostra o aspecto da bebida probiótica à base de suco de melão sonificado fermentada por *L. casei* B-442.

Figura 13: Aspecto visual do suco de melão fermentado por *L. casei* B-442.

4. CONCLUSÕES

- O tempo de fermentação de 8 horas foi eleito como ideal para a elaboração do suco de melão probiótico;
- O micro-organismo manteve-se viável com concentração de células viáveis adequada durante todo o período estudado (42 dias);
- O suco de melão probiótico desenvolvido pode ser considerado uma bebida de baixa caloria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: jan. 2011.

2. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry: Vitamins and other nutrients. Washington: AOAC, p.4, 2010.

3. BASTOS, M. S. R. **Processamento mínimo de melão *Cantaloupe* 'Hy-Mark': Qualidade e Segurança**. 2004. 178p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

4. BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA, O.; ORDUÑA, M.; MARTÍNEZ, F.; AGUILAR, B.; CORTÉS, A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: Effect on *Trichinella spiralis* infection. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.251-260, 1999.

5. COELHO, J. C. **Elaboração de bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei*.** 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

6. COLBÈRE-GARAPIN, F.; MARTIN-LATIL, S.; BLONDEL, B.; MOUSSON, L.; PELLETIER, I.; AUTRET, A.; FRANÇOIS, A.; NIBORSKI, V.; GROMPONE, G.; CATONNET, G.; VAN DE MOER, A. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. **Microbes and Infection**, v.9, p.1623-1631, 2007.

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

8. DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effectiveness of ascorbic acid as oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v.7, p.435-443, 1977[a].

9. DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v.7, p.31-41, 1997[b].

10. ELLI, M.; ZINK, R.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk. **International Dairy Journal**, v.9, p.507-513, 1999.

11. FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2003. 205 p.

12. FERREIRA, V. L. **Colorimetria em alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. 42 p.

13. GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, p.12-22, 1999.

14. IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos de composição dos alimentos. 4 ed. São Paulo: IAL, 2008.

15. KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.– their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.52, p.28-35, 1997.

16. LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

17. MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.935-942, 2008.

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

19. MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.S153-S157, 2002.

20. MOUSAVI, Z. E.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, doi: 10.1007/s11274-010-0436-1, 2010.

21. NANCIB, A.; NANCIB, N.; BOUDRANT, J. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactobacoccus lactis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p. 1423-1429, 2009.

22. NEVES, L. S. **Fermentado probiótico de maçã**. 2005. 106p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2005.

23. OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G.. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2002.

24. ØSTLIE, H. M.; HELLAND, M. H.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.17-27, 2003.

25. PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.162, p.166-180, 2009.

26. PRASAD, J.; McJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, p.917-925, 2003.

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

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

29. SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

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

31. VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v.33, p.97-102, 2000.

32. YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v.42, p.315-318, 2004.

CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a linhagem probiótica *L. casei* B-442 apresentou potencial fermentativo em suco de melão, não havendo necessidade de suplementação com nutrientes para a obtenção de valores adequados de pH (próximo a 4,5) e número de células viáveis.

A melhor condição de fermentação encontrada que garantisse um bom crescimento do micro-organismo além de assegurar a viabilidade celular necessária para que o produto seja considerado probiótico foi a temperatura de 31°C com o pH inicial do suco de 6,1.

O processamento ultra-sônico utilizando intensidade de 372,93 W/cm^2 durante 10 minutos melhorou as características de qualidade do suco reduzindo a atividade de enzimas deteriorantes, aumentando a homogeneidade sem causar danos à cor do produto.

Além disso, o suco de melão mostrou ser um bom veículo para a ingestão de bactérias probióticas, já que o conteúdo de células viáveis permaneceu superior a 8 log UFC/porção do produto, (valor preconizado pela legislação brasileira vigente) ao longo de todo período do estudo.

Neste trabalho foi demonstrada a vantagem tecnológica do uso de suco de melão como substrato para a fermentação probiótica uma vez que o pH natural do suco e sua composição em açúcares e aminoácidos livres tornam o meio propício para o rápido desenvolvimento de *Lactobacillus casei* NRRL B-442.

Estudos posteriores serão conduzidos para avaliar a aceitação do produto pelos consumidores.