



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Aline Sousa Silva

Maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal):

Extração e caracterização da polpa, efeito na viabilidade de
bactérias acidoláticas e aplicação em leites fermentados

São José do Rio Preto

2019

Aline Sousa Silva

Maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal):

Extração e caracterização da polpa, efeito na viabilidade de
bactérias acidoláticas e aplicação em leites fermentados

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Barretto
Penna

São José do Rio Preto

2019

Silva, Aline Sousa
S586m Maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Extração e caracterização da polpa, efeito na viabilidade de bactérias acidoláticas e aplicação em leites fermentados / Aline Sousa Silva. -- São José do Rio Preto, 2019
110 p. : 2 v.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

1. Frutas amazônicas. 2. Compostos bioativos. 3. Probióticos. 4. Alimentos funcionais. I. Título.

Aline Sousa Silva

Maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal):

Extração e caracterização da polpa, efeito na viabilidade de bactérias acidoláticas e aplicação em leites fermentados

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dr^a. Raquel Guttierres Gomes
UEM – Maringá

Profa. Dr^a. Natália Soares Janzantti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
18 de Novembro de 2019

A Deus razão do meu viver.
Aos meus pais, Abadia e Valdemar,
Meu esposo Odilon e meus filhos lindos Gustavo e Gabriella,
Por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos de minha vida.
Meu padastro Gilberto
E aos meus irmãos Márcio e Marciel,
Aos meus sobrinhos e sobrinhas,
E acima de tudo, aos meus companheiros de trabalho,
Que alegam meus dias, me dão força e coragem.

Meu amor por vocês é eterno!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a força maior, que rege e guia a minha vida.

Aos meus pais pela vida, pelo apoio, por compreender minha ausência, pelo abraço de conforto, de força e por saber que de braços abertos eu sempre serei esperada.

Aos meus companheiros queridos, esposo e filhos, Odilon, Gustavo e Gabriella que me fazem levantar todos os dias e lutar por uma vida melhor. Amo vocês.

À minha orientadora, Dr^a Ana Lúcia Barretto Penna, pela amizade, pelos ensinamentos compartilhados e imprescindíveis para a realização desse trabalho e na minha formação profissional. Foi graça a todo incentivo que recebi durante estes anos que hoje posso celebrar este marco na minha vida: mestrado concluído, um sonho realizado graças a você.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Aos meus amigos da Unesp, alguns ainda presentes e outros que já terminaram o programa, Tatiane Ferreira, Vívian Diamantino, Tais Borgonovi, Suzane Ferreira, Letícia Yuri, Ana Cecília Carnellosi, pela ajuda, conversas diárias e bons momentos compartilhados ao longo desses anos.

Juliana Kindler (in memoriam), não posso esquecer de você. Levo seu carinho, sua amizade e seu companheirismo na memória e agradeço sempre por tudo que vivemos. Desejo que esteja em paz, que Deus esteja ao seu lado e que, de alguma forma, minha fé possa levar estas palavras até você. Sinto sua falta amiga, sei que de longe te sinto me apoiando, meu anjo protetor.

Aos meus amigos e companheiros do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), Campus Barretos, que sempre me incentivaram na realização desse trabalho.

Às professoras Dr^a Maria Aparecida Mauro pela ajuda nas análises de cor e a Dr^a Natália Soares Janzantti pela ajuda nos cálculos e discussão dos resultados de minhas análises.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do IBILCE-UNESP pelos conhecimentos transmitidos.

Ao professor Dr. Svetoslav Dimitrov Todorov pela doação da cepa de *L. plantarum* utilizada neste trabalho e pelas informações sobre a cepa e ajuda durante toda a pesquisa.

Aos membros da banca pelas contribuições para a melhoria da qualidade deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta me apoiaram e contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

Obrigada.

RESUMO

O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um fruto de origem amazônica, rico em compostos bioativos, vitaminas, minerais, fibras, compostos fenólicos e carotenoides. Por conter compostos bioativos na polpa e na casca, alguns estudos mostraram que o fruto apresenta benefícios para a saúde, e por isso é considerado promissor para o desenvolvimento de novos produtos. A adição de ingredientes contendo compostos bioativos aos produtos lácteos contendo probióticos tem sido uma proposta inovadora por aumentar os efeitos benéficos dos produtos lácteos fermentados. O objetivo desse trabalho foi efetuar a extração e a caracterização da polpa do fruto maná-cubiu, avaliar as condições para conservação da polpa e seu efeito na viabilidade de bactérias acidoláticas (BAL), assim como avaliar o efeito da polpa de maná-cubiu em leite fermentado potencialmente probiótico. Inicialmente, foi realizada a extração da polpa e a caracterização do fruto *in natura* e da polpa pela avaliação da composição centesimal e de compostos bioativos. O fruto apresentou $93,44 \pm 0,21\%$ de umidade, $0,34 \pm 0,04\%$ de lipídeos, $0,49 \pm 0,03\%$ de proteínas, $0,47 \pm 0,05\%$ de cinzas, $5,26 \pm 0,29\%$ de carboidratos, expressos em base úmida, $3,83 \pm 0,05\%$ de pH, $1,19 \pm 0,02\%$ acidez, $5,80 \pm 0,08\%$ brix e $26,06$ kcal/100 g de valor energético. A polpa de maná-cubiu apresentou predominância da cor vermelha (+a*), amarela (+b*) e laranja (*Hue*). Houve alteração dos parâmetros de cor durante os 40 dias de armazenamento. Para a conservação da polpa, foram avaliados os efeitos do tratamento térmico (70 °C por 5,0, 7,5 e 10,0 min) e da adição de ácido cítrico (0,5, 0,75 e 1,0%) sobre a retenção dos compostos bioativos e atividade antioxidante. As amostras de polpa tratada foram armazenadas a -80 °C e analisadas durante o armazenamento (1, 20 e 40 dias). As amostras de polpa submetidas aos diferentes tratamentos e estocadas apresentaram 1,54 a 4,56 mg EAG/g de CFT, 3,32 a 5,58 µg de β-caroteno/g e 3,54 a 6,14 µg de luteína/g, atividade antioxidante de 3,31 a 10,59 µmol trolox/g pelo método DPPH e de 8,79 a 31,09 µmol trolox/g pelo método FRAP. Houve redução dos compostos bioativos durante os 40 dias de armazenamento. A análise dos componentes principais dos diferentes tratamentos mostrou que as amostras dos tratamentos 3 (70 °C/5 min e 1,0% de ácido cítrico) e 5 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico) foram caracterizadas pelo maior teor de compostos bioativos e atividade antioxidante. A polpa submetida ao tratamento 5 foi selecionada para aplicação em leite fermentado potencialmente probiótico. Para avaliar o efeito da polpa de maná-cubiu sobre a

viabilidade de BAL, foram testadas as culturas *Streptococcus thermophilus* ST 080, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57, *L. casei* SJRP38, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. fermentum* SJRP30 e SJRP43, *L. plantarum* ST8Sh, *E. durans* SJRP29 e *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 na forma de cultura pura ou mista. *Lactobacillus plantarum* ST8 Sh apresentou a maior viabilidade na presença de polpa de maná-cubiu e foi utilizado na preparação do leite fermentado, em co-cultura com *S. thermophilus* ST 080. A polpa de maná-cubiu foi caracterizada antes da aplicação no leite fermentado. O leite fermentado foi preparado com adição de 3% de polpa de maná-cubiu e submetido a avaliações físico-químicas e microbiológicas. As amostras de leite fermentado apresentaram uma variação de 86,18 a 87,65% de umidade, 1,42 a 1,83% de cinzas, 4,11 a 4,38% de proteína, 0,13 a 0,16% de lipídeos, 6,44 a 7,60% de carboidratos e 44,25 a 48,78 kcal/100 g de valor energético, 4,41 a 4,94 de pH, 0,90 a 1,83 g ácido láctico/100 g, durante a estocagem. Houve pós acidificação no leite fermentado em todos os tratamentos e a capacidade de retenção de água reduziu ou se manteve estável durante o armazenamento. O leite fermentado por *S. thermophilus* ST 080, com e sem polpa de maná-cubiu e o leite fermentado por *L. plantarum* ST8Sh sem polpa de fruta apresentaram redução da sinérese ao longo do armazenamento. Os teores de compostos fenólicos aumentaram ao longo de 28 dias de armazenamento e variaram de 0,22 a 1,54 mg EAG/g (leite fermentado adicionado de polpa) e de 0,15 a 0,54 mg EAG/g (leite fermentado controle). A atividade antioxidante variou de 0,54 a 1,11 µmol trolox/g (leite fermentado adicionado de polpa) e 0,34 a 1,03 µmol trolox/g (leite fermentado controle) pelo método DPPH e de 0,44 a 1,57 µmol trolox/g (leite fermentado adicionado de polpa) e de 0,51 a 1,67 µmol trolox/g (leite fermentado controle) pelo método FRAP. Os compostos bioativos e a atividade antioxidante do leite fermentado aumentaram ao longo do armazenamento. O leite adicionado de polpa de maná-cubiu e fermentado por *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080 apresentou elevada viabilidade durante o armazenamento. As amostras de leite fermentado probiótico contendo polpa de maná-cubiu apresentaram potencial inovador e funcional, com aptidão para proporcionar efeitos benéficos aos consumidores. Estudos adicionais visando a otimização da formulação do produto, avaliação sensorial e dos efeitos benéficos à saúde são desejáveis.

Palavras-chave: Frutas amazônicas; Compostos bioativos; Probióticos; Alimentos funcionais.

ABSTRACT

Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) is an Amazonian fruit, rich in bioactive compounds, vitamins, minerals, fibers, phenolic compounds and carotenoids. Because it contains bioactive compounds in the pulp and in the skin, some studies have shown that the fruit has health benefits and, therefore, it is considered promising for developing new products. The addition of ingredients containing bioactive compounds to probiotic dairy products has been considered an innovative proposal for enhancing the beneficial effects of fermented dairy products. The objective of this study was to conduct the extraction and characterization of the cocona pulp, to evaluate its preservation conditions and its effect on the viability of lactic acid bacteria (BAL), as well as to evaluate its effect on potentially probiotic fermented milk. At first, the extraction of pulp and the characterization of fresh fruit and fruit pulp were carried out through the evaluation of the centesimal composition and bioactive compounds. The fruit presented $93.44 \pm 0.21\%$ moisture, $0.34 \pm 0.04\%$ lipids, $0.49 \pm 0.03\%$ protein, $0.47 \pm 0.05\%$ ash, $5.26 \pm 0.29\%$ carbohydrates, expressed on wet basis, $3.83 \pm 0.05\%$ pH value, $1.19 \pm 0.02\%$ acidity, $5.80 \pm 0.08\%$ brix, and 26.06 kcal/100 g energy value. The cocona pulp showed predominance of the red (+a*), yellow (+b*) and orange (Hue) colors. There were changes in the color parameters during the 40 days of storage. For the pulp preservation, the effects of heat treatment (70 °C for 5.0, 7.5 and 10.0 min) and the addition of citric acid (0.5, 0.75 and 1.0%) on the retention of bioactive compounds and antioxidant activity were evaluated. The treated pulp samples were stored at -80 °C and analyzed during storage (1, 20 and 40 days). The pulp samples were submitted to the different treatments and storage, and presented 1.54 to 4.56 mg GAE/g total phenolic contents (TPC); 3.32 to 5.58 μg β -carotene/g; 3.54 to 6.14 μg lutein/g; and antioxidant activity from 3.31 to 10.59 μmol trolox/g using the DPPH method, and from 8.79 to 31.09 μmol trolox/g using the FRAP method. Bioactive compounds reduced during the 40 days of storage. The principal component analysis of the different treatments showed that samples from treatments 3 (70 °C/5 min and 1.0% citric acid) and 5 (70 °C/7.5 min and 0.75% citric acid) were characterized by the higher bioactive compounds content and antioxidant activity. The pulp submitted to treatment 5 was selected for application in potentially probiotic fermented milk. To evaluate the effect of cocona pulp on LAB viability, *Streptococcus thermophilus* ST 080, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57, *L. casei* SJRP38, *L.*

rhamnosus GG ATCC 53103, *L. fermentum* SJRP30 and SJRP43, *L. plantarum* ST8Sh, *Enterococcus durans* SJRP29, and *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 in pure or mixed cultures forms were tested. *L. plantarum* ST8Sh presented the higher viability with cocona pulp and was used for the preparation of fermented milk, in co-culture with *S. thermophilus* ST 080. The cocona pulp was characterized before application in fermented milk, which was prepared by adding 3% cocona pulp and submitted to physicochemical and microbiological evaluations. The fermented milk samples showed a variation of 86.18 to 87.65% moisture, 1.42 to 1.83% ash, 4.11 to 4.38% protein, 0.13 to 0.16% lipids, 6.44 to 7.60% carbohydrates and 44.25 to 48.78 kcal/100 g of energy value, 4.41 to 4.94 pH value, and 0.90 to 1.83 g lactic acid/100 g, during storage. There was post acidification in the fermented milk for all treatments and the water holding capacity reduced or remained stable during storage. The milk fermented by *S. thermophilus* ST 080, with and without cocona pulp, and *L. plantarum* ST8Sh fermented milk without fruit showed a reduction in syneresis during storage. The contents of phenolic compounds increased throughout the 28 days storage and ranged from 0.22 to 1.54 mg GAE/g (fermented milk with pulp) and from 0.15 to 0.54 mg GAE/g (control fermented milk). The antioxidant activity ranged from 0.54 to 1.11 $\mu\text{mol trolox/g}$ (fermented milk with pulp) and 0.34 to 1.03 $\mu\text{mol trolox/g}$ (control fermented milk) using the DPPH method, and 0.44 to 1.57 $\mu\text{mol trolox/g}$ (fermented milk with pulp) using the FRAP method. The bioactive compounds and antioxidant activity of fermented milk increased over storage. The milk added of cocona pulp and fermented by *L. plantarum* ST8Sh and *S. thermophilus* ST 080 showed high viability during storage. The probiotic fermented milk samples with cocona pulp presented innovative and functional potential, with the ability to provide beneficial effects for the consumers. Additional studies aiming at the optimization of the product formula, as well as sensory and health beneficial effect evaluations are desirable.

Keywords: Amazonian fruits; Bioactive compounds; Probiotics; Functional food.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Matriz de ensaios do planejamento fatorial em dois níveis, com as variáveis nas unidades codificadas e originais para tratamento da polpa de maná-cubiu	40
Tabela 2.	Condições de cultivo das BAL que serão utilizadas na seleção	46
Tabela 3.	Caracterização química do fruto maná-cubiu	51
Tabela 4.	Valores de pH e de acidez (%) da polpa de maná-cubiu durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	52
Tabela 5.	Sólidos solúveis (%) e relação entre sólidos solúveis (%) e acidez (%) da polpa de maná-cubiu durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	53
Tabela 6.	Parâmetros de cor (L, a*, b* e h*) das polpas de maná-cubiu durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	55
Tabela 7.	Teores de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de polpa) durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	57
Tabela 8.	Teores dos carotenoides β -caroteno e luteína ($\mu\text{g/g}$) durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	60
Tabela 9.	Atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$) durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	62
Tabela 10.	Caracterização química do fruto de maná-cubiu para aplicação em leite fermentado. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	66
Tabela 11.	Análises físico-químicas da polpa de maná-cubiu processada conforme o tratamento 5 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico), durante 40 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	67
Tabela 12.	Perfil de ácidos graxos presente na polpa de maná-cubiu	68

Tabela 13.	Teores de compostos bioativos e atividade antioxidante no fruto e na polpa de maná-cubiu. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	70
Tabela 14.	Efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade de bactérias acidoláticas durante 24 h de incubação (log UFC/mL). Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	71
Tabela 15.	Composição centesimal de leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle). Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	76
Tabela 16.	Valores de pH em leite fermentado, fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	77
Tabela 17.	Acidez titulável em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	77
Tabela 18.	Capacidade de retenção de água (CRA) em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	78
Tabela 19.	Sinérese em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	80
Tabela 20.	Teores de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante o período 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	81
Tabela 21.	Atividade antioxidante de leite fermentado, obtido pelo método DPPH e FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$) (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante de 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão	83

Tabela 22. Viabilidade das BAL (log UFC/mL) em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Formatos, formas e tamanhos do maná-cubiu	20
Figura 2.	Principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças	26
Figura 3.	Estrutura química de antioxidantes naturais e sintético	27
Figura 4.	Estrutura molecular de alguns dos principais carotenoides	29
Figura 5.	Comprimento (A) e largura (B) do fruto maná-cubiu	39
Figura 6.	Retenção dos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) durante o armazenamento	58
Figura 7.	Análise de componentes principais baseada nos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) no primeiro dia de armazenamento	64
Figura 8.	Análise de componentes principais baseada nos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) aos 20 dias de armazenamento	65
Figura 9.	Análise de componentes principais baseada nos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) aos 40 dias de armazenamento	65
Figura 10.	Curva de acidificação do leite fermentado com <i>L. plantarum</i> ST8Sh (LP) e <i>S. thermophilus</i> ST 080 (ST) e <i>L. plantarum</i> em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (LP + ST), adicionado de polpa de maná-cubiu (F) e controle (C)	74
Quadro 1.	Frequência (%) de formas dos frutos em 29 variedades de maná-cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i>) da coleção de germoplasma do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Maná-cubiu	19
3.1.1	Características gerais	19
3.1.2	Composição química	21
3.1.3	Processamento do fruto	22
3.2	Compostos bioativos	23
3.2.1	Compostos fenólicos	24
3.2.2	Atividade antioxidante	25
3.2.3	Carotenoides	28
3.2.4	Compostos bioativos do maná-cubiu e seus efeitos benéficos	29
3.3	Bactérias acidoláticas (BAL) e utilização em alimentos	31
3.3.1	Bactérias probióticas	33
3.4	Leite fermentado	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Obtenção e caracterização física do fruto maná-cubiu	39
4.2	Avaliação das condições para conservação da polpa de maná-cubiu	39
4.3	Composição centesimal da polpa de maná-cubiu	40
4.4	Sólidos solúveis totais (°Brix), potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável	41
4.5	Colorimetria	42
4.6	Compostos bioativos e atividade antioxidante	42
4.6.1	Obtenção do extrato e determinação dos compostos fenólicos	42
4.6.2	Obtenção do extrato e determinação de carotenoides	43
4.6.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•	44
4.6.4	Determinação da atividade antioxidante método de redução do ferro (FRAP)	44

4.6.5	Análise estatística dos resultados da caracterização da polpa de maná-cubiu	45
4.7	Avaliação da viabilidade de BAL na presença de polpa de maná-cubiu	45
4.8	Preparo do leite fermentado e caracterização físico-química	47
4.8.1	Preparo do leite em pó reconstituído	47
4.8.2	Preparo do leite fermentado	47
4.8.3	Caracterização físico-química do leite fermentado	48
4.8.4	Caracterização de compostos bioativos no leite fermentado	48
4.9	Viabilidade celular das BAL em leite fermentado	49
4.10	Análise estatística dos resultados do leite fermentado	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Obtenção e caracterização física do fruto maná-cubiu	50
5.2	Composição centesimal e valor energético do fruto maná-cubiu	50
5.3	Valor de pH, acidez e sólidos solúveis do fruto e da polpa de maná-cubiu	51
5.4	Colorimetria	54
5.5	Compostos bioativos: compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides e atividade antioxidante	56
5.5.1	Compostos fenólicos totais (CFT)	56
5.5.2	Carotenoides	59
5.5.3	Atividade antioxidante	61
5.5.4	Análise de componentes principais (ACP) utilizando compostos bioativos e atividade antioxidante	63
5.6	Aplicação da polpa de maná-cubiu em leite fermentado: Caracterização físico-química e análises de biocompostos	66
5.6.1	Caracterização físico-química do fruto inteiro e da polpa de maná-cubiu	66
5.6.2	Compostos bioativos presentes no fruto e na polpa de maná-cubiu aplicada no leite fermentado	69
5.6.3	Efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade de BAL	70

5.6.4	Curva de acidificação de leite fermentado com <i>L. plantarum</i> ST8Sh e <i>S. thermophilus</i> ST 080	73
5.7	Caracterização físico-química, determinação de biocompostos e análise microbiológica do leite fermentado	75
5.7.1	Composição centesimal, pH, acidez, capacidade de retenção de água (CRA) e sinérese do leite fermentado	75
5.7.2	Biocompostos em leite fermentado	80
5.7.3	Carotenoides em leite fermentado	81
5.7.4	Viabilidade celular das BAL em leite fermentado	82
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO A Extração de compostos bioativos do fruto maná-cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal) com diferentes solventes	104

1 INTRODUÇÃO

O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), fruto nativo da região Amazônica, possui sabor ácido, é succulento e tem aroma agradável. Possui alto valor nutricional, é rico em antioxidantes, compostos fenólicos, vitaminas, minerais, fibras, carotenoides, e por isso, pode apresentar potencial agroindustrial. Na região amazônica é consumido *in natura* ou utilizado no preparo de alimentos diversos, tais como sucos, sorvetes, compotas e doces. Popularmente é utilizado para o controle do colesterol, triglicerídeos, anemia, diabetes, entre outros males (SILVA FILHO; MACHADO, 1997b). Apesar de ser utilizado pela população local para esses fins, existem poucos estudos que comprovem seus efeitos benéficos.

As propriedades terapêuticas do maná-cubiu podem estar relacionadas ao seu conteúdo de compostos bioativos, tal como β -caroteno, que possui atividade pró-vitamina A e atividade antioxidante. Esta atividade está relacionada com a capacidade de sequestrar os radicais livres, como o oxigênio singlete e os radicais peroxil (CARDONA-JARAMILLO, 2011). A polpa do maná-cubiu 5 tipos de compostos fenólicos, sendo o majoritário o ácido 5-cafeoilquinóico e 17 tipos de carotenoides, sendo os majoritários all-*trans*- β -caroteno, all-*trans*-luteína, 9 *cis*-luteoxantina, all-*trans*-luteoxantina e all-*trans*-violaxantina (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

As frutas e vegetais possuem um alto conteúdo de nutrientes, como antioxidantes, compostos bioativos, fibras, minerais, vitaminas e carotenoides (PERES *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2010). Por esta razão, os subprodutos das frutas e vegetais (polpa, cascas, sementes) podem ser usados no desenvolvimento de novos produtos, para enriquecer os produtos com fibras alimentares ou com compostos bioativos ou prebióticos, que favorecem o crescimento das bactérias probióticas. Além disso, estes subprodutos podem melhorar as propriedades sensoriais, como sabor, aroma, textura e cor, bem como diversificar os produtos disponíveis no mercado e aumentar o valor nutricional (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2011; BORGONOV, 2018). Em vista disso, sua aplicação em leite fermentado probiótico representa vantagens potenciais e alternativas valiosas para a indústria de lácteos (VINDEROLA *et al.*, 2002).

Dentre os produtos lácteos fermentados, o leite fermentado é um dos mais populares em todo o mundo. Ele é obtido da acidificação do leite por meio da atividade

metabólica das bactérias acidoláticas (BAL), que alteram as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do produto. Para a fabricação de leite fermentado podem ser utilizados *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias acidoláticas, que contribuam para a obtenção de características específicas do produto final. Estas BAL podem promover benefícios à saúde do consumidor, se ingeridas regularmente.

Considerando o elevado valor nutricional dos frutos de maná-cubiu e a carência de trabalhos científicos que evidenciem as potencialidades de aplicação desse fruto ou dos derivados para obtenção de alimentos funcionais, este estudo pretende desenvolver produtos fermentados inovadores e funcionais, assim como contribuir para o entendimento da ação dos compostos bioativos do maná-cubiu na viabilidade das BAL. Além disso, este estudo explora novas formas de consumo do maná-cubiu, que poderá agregar valor à cadeia produtiva deste fruto, e consequentemente, valorizar a biodiversidade brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Efetuar a extração e a caracterização da polpa do fruto maná-cubiu, avaliar as condições para conservação da polpa e seu efeito na viabilidade de bactérias acidoláticas (BAL), assim como avaliar o efeito da polpa de maná-cubiu em leite fermentado potencialmente probiótico.

2.2 Objetivos Específicos

- Efetuar a extração da polpa de maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) e avaliar as características físico-químicas, incluindo compostos fenólicos totais, carotenoides totais e atividade antioxidante;
- Avaliar o efeito do tratamento térmico (70 °C por 5,0, 7,5 e 10,0 min) e da adição de ácido cítrico (0,5, 0,75 e 1,0%) sobre a retenção dos compostos bioativos e atividade antioxidante durante 40 dias de armazenamento;
- Avaliar o efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade de bactérias acidoláticas potencialmente probióticas e selecionar as culturas com maior viabilidade para aplicação em leite fermentado;
- Aplicar a polpa tratada de maná-cubiu em leite fermentado e efetuar a caracterização físico-química e microbiológica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Maná-cubiu

3.1.1 Características gerais

O fruto maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é uma hortaliça pertencente à família Solanaceae e está distribuída nas regiões úmidas equatoriais do Brasil, Peru e Colômbia (SILVA FILHO *et al.*, 1999). É nativo da região Amazônica, porém também está presente em outras regiões do Brasil, como por exemplo no estado de São Paulo, de onde tem sido comercializado para todas as regiões do Brasil (SILVA FILHO *et al.*, 1996). O fruto recebe diferentes denominações de acordo com a região onde é cultivado. No Brasil é denominado cubiu, maná, maná-cubiu ou tomate de índio (OLIVEIRA, 1999). Em países de língua espanhola é chamado de “tupiro”, “topiro”, “cocona”, enquanto em países de língua inglesa é conhecido como “Orinoco apple” e “peach tomato” (SILVA FILHO *et al.*, 1999).

A família Solanaceae é uma das famílias mais importantes para a agricultura mundial, compreende muitas espécies herbáceas, arbóreas, arbustivas, epífitas e trepadoras, que se caracterizam pela sua composição nutricional e farmacológica (CARDONA-JARAMILLO, 2011). As principais espécies pertencentes a esta família incluem o tomate, a berinjela e a pimenta, as quais fazem parte dos hábitos alimentares das populações de diversas culturas (SEGUI, 2016).

O fruto apresenta até 8 formas (Quadro 1), sendo as formas mais comuns cordiforme e cilíndrica. O tamanho do fruto varia de 3,0 a 9,3 cm e o peso varia de 20 a 450 g (Figura 1). A composição química e nutricional é oscilante, dependendo do ecotipo e da região onde é plantada; a coloração do fruto muda de verde na fase imatura a alaranjado quando maduros (SILVA FILHO, 1994; SILVA FILHO *et al.*, 2005; TORRES, 2010; YUYAMA *et al.*, 2007).

Frente ao interesse por parte dos consumidores por alimentos saudáveis e naturais, alguns produtores priorizam o plantio de variedades de frutos nativos e exóticos, como o maná-cubiu, que além do valor nutricional, podem se tornar novas fontes de renda para a população local (CARDONA-JARAMILLO, 2011; LORENZI *et al.*, 2006).

Figura 1. Formatos, formas e tamanhos do maná-cubiu.



Fonte: Elaborado pelo autor

Quadro 1. Frequência (%) de formas dos frutos em 29 variedades de maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum*) da coleção de germoplasma do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Forma	Frequência %
Cordiforme	31,0
Cilíndrico	20,7
Levemente Achatado	17,2
Achatado Irregular	13,8
Redondo Angular	6,9
Achatado	3,5
Cordiforme Irregular	3,5
Redondo/Globoso	3,5

Fonte: Adaptado de SILVA FILHO, 1994

O plantio do maná-cubiu é realizado em pequena escala por produtores rurais e distribuído nas feiras e mercados das cidades interioranas do amazônias (SCHUELTER *et al.*, 2009). É pouco consumido pelos brasileiros, podendo ser classificado como uma planta alimentícia não convencional (PANC), terminologia atribuída por Kinupp (2007), para as plantas que possuem uma ou mais partes comestíveis, são nativas ou cultivadas, consumidas regionalmente e que não estão incluídas na alimentação cotidiana da maioria da população.

Além do consumo *in natura*, o maná-cubiu é também utilizado no processamento de geleias. Este fruto tem se constituído uma importante matéria-

prima para a agroindústria moderna, por ser rica em pectina. Esta característica tem estimulado alguns agricultores a ampliarem a área plantada, que em alguns casos, ultrapassam 2 hectares. O mercado externo também se revela promissor. No Peru, os produtos industrializados (sucos, geleias, compotas e doces) têm ampla aceitação no comércio interno, sendo também exportados para países europeus (PEREIRA, 2001).

3.1.2 Composição química

O maná-cubiu é um fruto succulento, com alto teor de umidade (88 a 93%) e 5 a 8% de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), sendo a maioria açúcares redutores (4,6%) (SILVA FILHO; MACHADO, 1997a). Apresenta baixa relação sólidos solúveis/acidez, o que confere ao fruto a característica ácida, atributo que é importante para a produção de doces, geleias, sucos, sorvetes e compotas.

Este fruto apresenta quantidades expressivas de fibras, quando comparado com os outros frutos da mesma família, e apresenta também quantidades consideráveis de fósforo, vitamina C e pectina (2,1%) (MACEDO, 1999). A utilização de alimentos integrais e dietas ricas em fibra solúvel são bem conhecidas por seu efeito sobre o trânsito intestinal, principalmente a pectina, que pode se ligar aos ácidos biliares, atuar na troca de cátions, modificar a biodisponibilidade de minerais e ainda influenciar em alguns pontos do metabolismo glicídico e lipídico (OLIVER; MARCHINI, 2001).

A concentração de niacina no maná-cubiu é superior à da berinjela, 2.500 μ g e 0,6 μ g, respectivamente, e reconhecidamente um dos vegetais mais ricos nesta substância. A niacina contribui para um sistema digestivo saudável, melhora a circulação e reduz a pressão arterial, o colesterol e os triacilglicerois (OLIVER; MARCHINI, 2001).

O maná-cubiu é altamente dietético, possui baixo aporte calórico, o que sugere sua indicação na dieta de pacientes hipercolesterolêmicos e hiperglicêmicos (YUYAMA *et al.*, 1997). De Andrade e Andrade (2012) verificaram que em relação aos outros frutos da família Solanaceae na fase madura, o maná-cubiu é relativamente pobre em macronutrientes (como lipídeos e proteínas), entretanto, apresenta quantidades significativas de metabólitos secundários, como por exemplo carotenoides. Estudos com maná-cubiu mostraram altos teores de potássio, zinco, selênio, ferro, manganês e cobre (BJELAKOVIC *et al.*, 2012; DE ANDRADE; ANDRADE, 2012; DOS SANTOS, 2007; MARX; ANDRADE; MAIA, 1998; SILVA

FILHO, 2002). Nestes estudos foi constatada uma ampla variação nos teores de cinzas (6,2 a 12%), proteína bruta (2,3 a 9,2%), lipídeos (1,3 a 27,2%) e carboidratos (58,5 a 87,3%) em base seca (SALICK, 1992; SILVA FILHO *et al.*, 1997). De acordo com Fujita, Lopes e Campos (2012), o maná-cubiu possui as seguintes enzimas: pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD). Estas enzimas possuem diferentes temperaturas e valores de pH para inativação, e dependem do tipo de matriz alimentícia onde estão presentes (EVANGELISTA, 2008).

3.1.3 Processamento do fruto

Após a colheita os vegetais sofrem modificações físico-químicas e nutricionais, resultando em perdas de qualidade. Para a conservação das características de qualidade é fundamental o uso de tecnologias de conservação (PIGOLI; VIEITES; DAIUTO, 2014). No entanto, qualquer que seja o processamento, por mais simples que seja, traz consequências nas características físico-químicas e nutricionais, sendo imprescindível estudar as alterações dessas características (GOMEZ-CACERES *et al.*, 2009).

Em geral, a combinação de diferentes métodos de conservação, tais como redução de pH, tratamento térmico, uso de atmosfera modificada e uso de substâncias antimicrobianas naturais, tem sido usada com estratégia para conservação de alimentos. Este processo resulta em extensão da vida de prateleira e pequeno impacto nas propriedades nutricionais e sensoriais (REIS *et al.*, 2012).

O maná-cubiu normalmente é consumido in natura e poucas tentativas de industrializá-lo têm sido realizadas. Diversos estudos foram realizados visando a produção de doces, geleias, compotas, saladas, molhos para carnes e medicamentos caseiros ou industrializados (SILVA FILHO, 2002). O processamento do fruto, tal como extração, tratamento da polpa e envase, assim como a elaboração de derivados de maná-cubiu são importantes para a conservação das características do fruto, assim como para aumentar sua vida de prateleira.

Para a conservação da polpa do maná-cubiu, a redução do valor de pH e o tratamento térmico são cruciais para garantir a segurança do produto, assim como para inativar enzimas responsáveis pelo escurecimento da polpa. O pH ótimo de atividade das enzimas presentes no maná-cubiu varia de 4,5 a 7,5, sendo que o ácido

cítrico pode agir como redutor do pH ou como quelante do cobre (centro catalítico) da enzima PPO (SANTOS *et al.*, 2012). Considerando que o pH ácido facilita a destruição de micro-organismos pelo calor, o tempo de tratamento térmico pode ser menor, minimizando os efeitos negativos de aplicação de calor sobre os compostos bioativos do produto.

A enzima PPO é uma das mais importantes responsáveis pelo escurecimento enzimático e degradação dos compostos bioativos, tais como ácido ascórbico, polifenóis e pectinas (BRIONGOS *et al.*, 2016). O aquecimento da enzima PPO a temperaturas entre 70°C e 90°C, por curto período, é suficiente, na maioria dos casos, para a inativação de suas funções catalíticas. Esta enzima apresenta faixa de pH ótimo entre 5,0 a 7,0 e em condições de pH < 3,0, são inativadas. A enzima PME é inativada a 80 °C/20 s e em pH < 3,8 (TRIBESS, 2003; TRIBESS; TADINI, 2006). A enzima POD é rapidamente inativada a 72 °C em suco de tomate (ANTHON *et al.*, 2002), enquanto a enzima PG é uma enzima termolábil, e totalmente inativada a 65 °C/5 min em espécies de tomate (FACHIN *et al.*, 2003).

Fujita, Vieites e Daiuto (2013) submeteram os frutos de maná-cubiu a diferentes cortes (pedaços e fatias) e a concentrações variadas de ácido ascórbico (1 a 3%). As diferentes concentrações de ácido ascórbico não mostraram efeito expressivo na conservação do maná-cubiu pelos parâmetros avaliados (pH, sólidos solúveis, acidez titulável e perda de massa fresca).

3.2 Compostos Bioativos

Compostos bioativos são classificados em substâncias nutraceuticas e substâncias tóxicas. As substâncias nutraceuticas são compostos ativos e derivados naturais que promovem a saúde, estão associados a redução da incidência de doenças, têm propriedades medicinais e apresentam benefícios a saúde humana. As substâncias tóxicas são compostos químicos de origem natural ou induzidos por processos que exercem efeitos adversos a saúde humana. Frutas, vegetais, grãos, frutos oleaginosos, produtos marinhos, plantas medicinais, produtos com ervas contêm tanto substâncias nutraceuticas como tóxicas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os compostos bioativos, como os carotenoides e compostos fenólicos, possuem importantes funções e ações biológicas, por isso são considerados promotores da saúde humana. A ingestão de frutas e vegetais está associada a

diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular, entre outras. A presença dos carotenoides, compostos fenólicos, vitaminas, minerais e fibras nos alimentos se destacam pelas ações benéficas aos seres humanos (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SEPTEMBRE-MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2018; STANNER *et al.*, 2003).

3.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais representativos do reino vegetal. Sua estrutura é composta de um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, ou de polímeros como substituintes, podendo apresentar outros grupamentos como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (ANGELO; JORGE; 2007; MARTÍNEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000; MENDONÇA *et al.*, 2003; PRADO, 2009).

O grupo de compostos fenólicos são frequentemente chamados de "fenóis" e são compostos por aproximadamente 8000 compostos naturais, como por exemplo os fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Estes fitoquímicos são derivados da fenilalanina e tirosina (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos são sintetizados durante as fases de desenvolvimento e em condições de estresse (ferimentos, infecções, radiações UV, injúrias dos tecidos, contra a ação de subprodutos provenientes da fotossíntese e também contra plantas herbívoras) dos vegetais. São essenciais na reprodução, na ação antipatogênica, na produção de pigmentação, no desenvolvimento das plantas e na síntese de lignina. Também atuam na formação de características sensoriais e nutricionais dos vegetais, conferindo gosto amargo ou sensação adstringente, contribuindo no desenvolvimento de cor e odor, assim como promovendo a estabilidade oxidativa do produto alimentício (ANGELO; JORGE, 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004; SOUSA, 2009).

Os compostos fenólicos inibem a peroxidação lipídica e as lipoxigenases *in vitro*, pela capacidade de sequestrar radicais livres, tais como hidroxílicos, superóxidos e peroxílicos, os quais reconhecidamente promovem o estresse oxidativo celular (LEONG; SHUI, 2002; LEONTOWICZ *et al.*, 2007; OKONOGI *et al.*, 2007; TACHAKITTIRUNGROD *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende de sua estrutura, do número de hidroxilas, das posições dos grupos hidroxilas e da natureza das

substituições nos anéis aromáticos (BAXTER; HARBORNE; MOSS, 1998). Os compostos fenólicos podem ser encontrados na forma livre ou conjugada, sendo a maior parte conjugada com mono e polissacarídeos, ligado a um ou mais dos grupos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Também podem ocorrer como derivados funcionais, como por exemplo ésteres metílicos, que estão presentes em frutas e hortaliças (BAXTER; HARBORNE; MOSS, 1998). Na Figura 2 estão representadas as principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças.

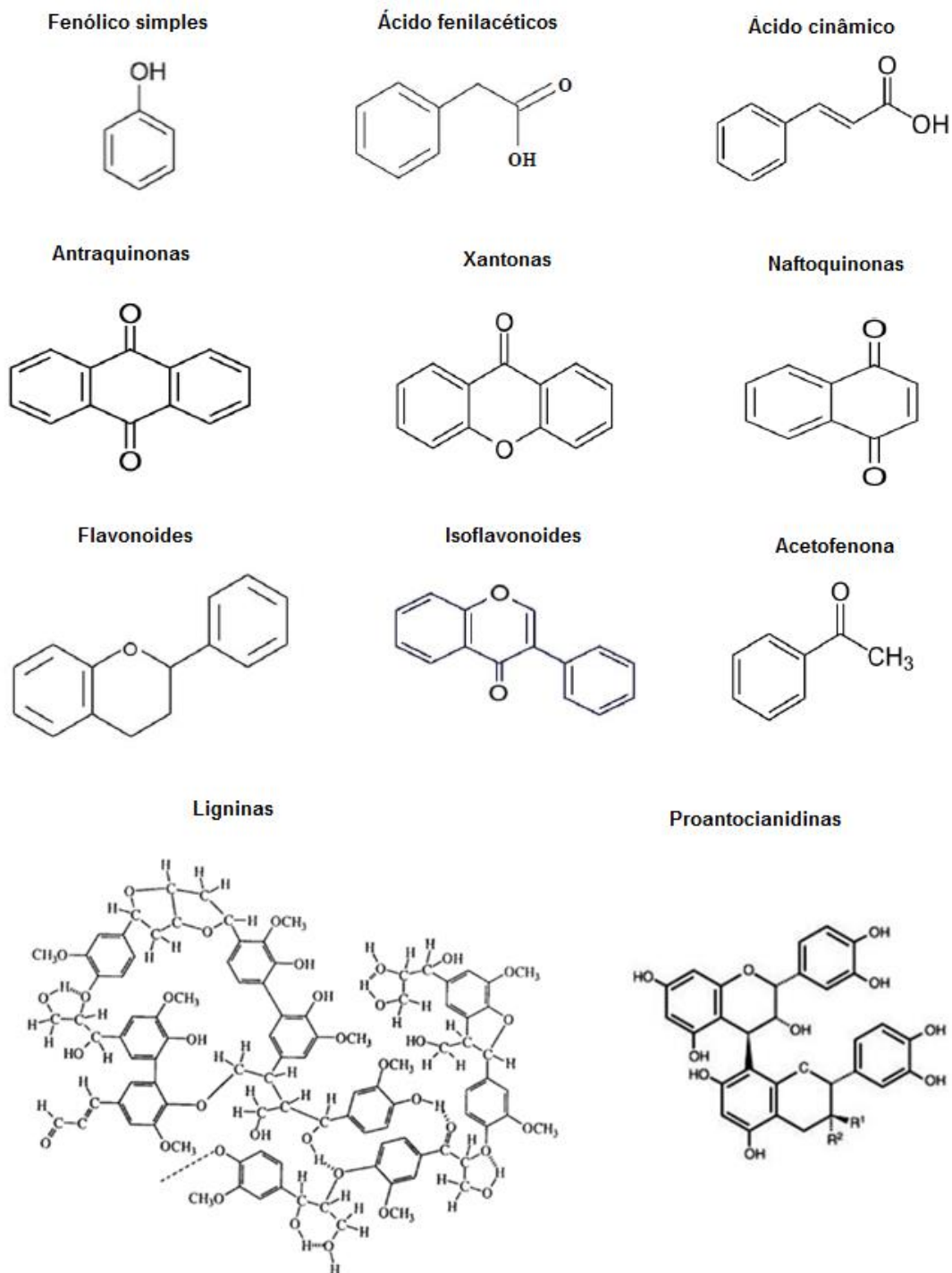
Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas nos seres humanos, como atividade antialergênica, antioxidante, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, imunomoduladora, neuroprotetiva, cardioprotetora e vasodilatadora (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; FERREIRA; MARTINS; BARROS, 2017).

3.2.2 Atividade Antioxidante

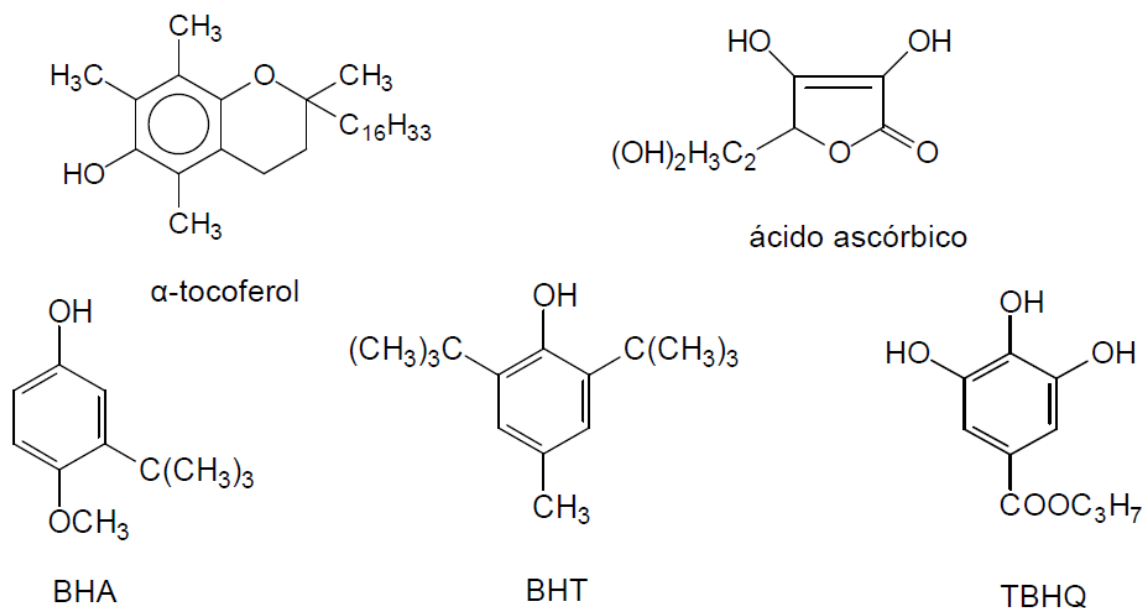
Antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação (como rancificação e formação de sabor desagradável em alimentos) estando presente mesmo em pequenas concentrações, quando em comparação com o agente oxidante (SILVA *et al.*, 2010). São substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes, compostos com atividade enzimática e sem essa atividade. A primeira classe compreende os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. As enzimas superóxido-dismutase, catalase, glutationala-peroxidase e glutationala redutase são alguns exemplos de enzimas com atividade antioxidante (VALKO *et al.*, 2007). Na segunda classe, os compostos sem atividade enzimática interagem com os radicais e são alterados durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno. Entre os compostos fenólicos sintéticos os mais utilizados são o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroquinona-terciária (TBHQ), todos ilustrados na Figura 3 (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Figura 2. Principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças.



Fonte: FERREIRA, 2015.

Figura 3. Estrutura química de antioxidantes naturais e sintéticos.

Fonte: Adaptado de DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010.

As reações de oxidação nos alimentos podem resultar em alteração do valor nutricional, assim como nos padrões de qualidade sensorial, tais como odor, cor, sabor e textura. A oxidação de vitaminas, por exemplo, pode ocorrer durante o processamento térmico dos alimentos. Os agentes oxidantes altamente reativos também causam oxidação de vários aminoácidos, tais como metionina, cisteína, triptofano e tirosina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A oxidação lipídica pode ocorrer durante o processamento, a distribuição, o armazenamento e o preparo dos alimentos. Por meio destas reações são gerados produtos sensorialmente inaceitáveis, além de provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, por meio da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (JORGE, 2009).

Os antioxidantes são utilizados na indústria de alimentos para evitar ou prevenir a oxidação dos componentes dos alimentos e manter o valor nutricional. Eles também ajudam na proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO's) e doenças degenerativas (SILVA *et al.*, 2010). Os mecanismos de ação dos antioxidantes incluem a redução da concentração de oxigênio, prevenção da fase de iniciação da oxidação, ação quelante de íons metálicos, sequestrante de

radicais livres e decomposição dos produtos primários a compostos que não são radicais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.2.3 Carotenoides

Os carotenoides são compostos amplamente distribuídos na natureza, apresentam estruturas químicas diversas e funções variadas. São pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo, laranja ou vermelho de muitas frutas, hortaliças, gema de ovo, crustáceos cozidos e alguns peixes. São também substâncias bioativas, com efeitos benéficos à saúde, e alguns deles apresentam atividade pró-vitâmica A (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Os carotenoides são biossintetizados por plantas, algas, fungos, leveduras e bactérias (RAO, 2007). Possuem ações anticarcinogênicas, imunomoduladoras, preventivas das doenças cardiovasculares e da degeneração macular relacionada à idade (MANDELLI, 2010).

Os carotenoides pertencem a classe dos antioxidantes naturais; eles podem atuar sequestrando os radicais livres e inibindo a propagação da reação em cadeia tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SOUZA; TAVARES, 2008). Os efeitos sequestrantes de radicais são proporcionais à quantidade de ligações duplas conjugadas, contidas nas moléculas dos carotenoides que reagem com os radicais peróxidos e oxigênio livres (SHAMI; MOREIRA, 2004). Os carotenoides sequestram o oxigênio singleto de duas maneiras: por transferência física da energia de excitação do oxigênio singleto para o carotenoide, resultando na formação de carotenoide tripleto, que é capaz de retornar ao estado não excitado após dissipar o seu excesso de energia como calor, ou por meio de uma reação química entre o oxigênio singleto e o carotenoide, resultando na destruição irreversível desse último (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

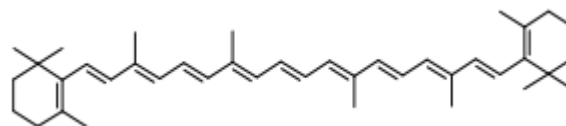
Os carotenoides, β -caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (SHAMI; MOREIRA, 2004). O licopeno, a luteína, a zeaxantina e a bixina são encontrados em alimentos e possuem função bioativa (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). A Figura 4 mostra a estrutura molecular de alguns dos principais carotenoides (McNULTY *et al.*, 2007).

Os carotenoides presentes naturalmente nos alimentos ou adicionados intencionalmente, proporcionam cor aos alimentos, contribuindo no aspecto visual, na aceitação e na escolha de um alimento pelos consumidores (CLYDESDALE, 1993). A

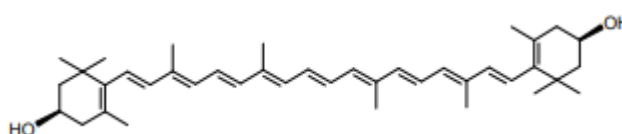
adição destes compostos naturais aos alimentos é benéfica, pois seu potencial antioxidante, previne por exemplo, a oxidação lipídica dos alimentos e matérias-primas alimentares, como óleos, carnes, leite e seus derivados, estendendo a sua vida-de-prateleira (DECKER *et al.*, 2005).

Figura 4. Estrutura molecular de alguns dos principais carotenoides.

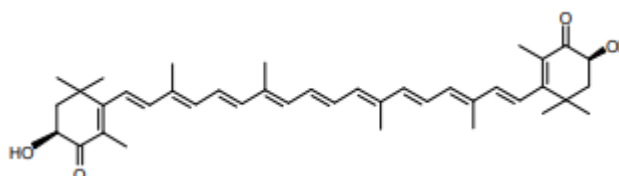
β -caroteno



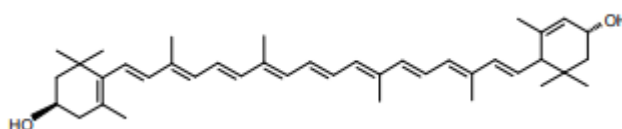
Zeaxantina



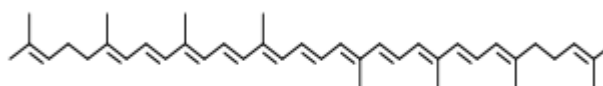
Astaxantina



Luteína



Licopeno



Fonte: Adaptado de McNULTY *et al.*, 2007.

3.2.4 Compostos bioativos do maná-cubiu e seus efeitos benéficos

As frutas, de maneira geral, possuem compostos bioativos (funcionais), que auxiliam na redução da incidência de doenças (ALMEIDA *et al.*, 2011; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2012). O maná-cubiu possui compostos bioativos que estão relacionados à sua atividade antioxidante, com potenciais efeitos benéficos na saúde. Na região amazônica, as populações nativas utilizam o maná-cubiu como alimento, medicamento e cosmético (YUYAMA *et al.*, 2007).

Maia *et al.* (2015) avaliaram o consumo de farinha de maná-cubiu sobre a lipemia de ratos hipercolesterolêmicos e observaram que a administração da farinha

de maná-cubiu reduziu as concentrações de colesterol total e colesterol hepático e aumentou a excreção de colesterol pelas fezes, confirmando o uso popular do fruto como hipocolesterolemiante.

Na polpa do maná-cubiu foram identificados 5 tipos de compostos fenólicos e 17 tipos de carotenoides. Entre os compostos fenólicos mais abundantes foram encontrados o ácido 5-cafeoilquínico (1351 µg/g de polpa), duas espermidinas bis e tris dihidrocafeoil (199 µg/g e 158 µg/g de polpa, respectivamente). Entre os carotenoides majoritários foram encontrados o *all-trans*-β-caroteno (7,15 µg/g de polpa), *all-trans*-luteína (2,41 µg/g de polpa), 9 *cis*-luteoxantina (1,33 µg/g de polpa), *all-trans*-luteoxantina (1,30 µg/g de polpa) e *all-trans*-violaxantina (0,98 µg/g de polpa) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

Dentre os compostos bioativos encontrados nos alimentos, os carotenoides e os compostos fenólicos têm sido amplamente pesquisados nos últimos anos, sendo evidenciados efeitos protetores frente aos agentes indutores de danos ao DNA (CHEN; KONG, 2005). Estimativas indicam que entre 90-95% dos cânceres existentes estão relacionados aos fatores ambientais e ao estilo de vida das pessoas, incluindo hábitos alimentares (ANAND *et al.*, 2008). Durante a alimentação ocorre a ingestão de compostos mutagênicos, como por exemplo os nitratos, nitrosaminas, praguicidas e micotoxinas. Estas substâncias podem alterar o funcionamento normal da célula, desencadeando inúmeros processos patológicos, inclusive o desenvolvimento do câncer (ANAND *et al.*, 2008; PRESTON, 2007).

O β-caroteno destaca-se por sua potente ação antioxidante, com atuação na captura do oxigênio singlete, atribuída à sua longa cadeia com duplas ligações conjugadas, que possibilita a interação com espécies reativas (STAHL; SIES, 2005; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

A luteína é um antioxidante que previne os danos causados pelos radicais livres nos tecidos. Este carotenoide tem a função de filtrar a luz azul de alta energia sobre espécies reativas de oxigênio ativadas pela luz, em plantas e humanos (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004). Estudos realizados por Nishino *et al.* (2000) demonstraram que os ratos induzidos ao câncer de pele e que foram suplementados com luteína tiveram uma incidência significativamente menor, quando comparados aos que não receberam o suplemento.

Rodrigues, Mariutti e Mercadante (2013) determinaram a composição do extrato fenólico do maná-cubiu, sendo que o ácido clorogênico é o constituinte

majoritário 1298 µg/g de polpa (70%). Este composto apresenta baixa biodisponibilidade, no entanto, os produtos de seu metabolismo apresentam efeitos antioxidantes expressivos, tais como os ácidos cafeico, ferúlico e quínico. Os efeitos benéficos do ácido clorogênico foram citados por Shimoyama *et al.* (2013). Em testes em camundongos expostos a etanol/HCl, houve redução das lesões gástricas nos animais que receberam o antioxidante.

Em testes *in vitro* o ácido clorogênico (isolado) foi eficaz na proteção de células cardíacas (cardiomiócitos) frente ao agente antimorral doxorubicina (CHLOPCIKOVA *et al.*, 2004). No estudo realizado por Hernandez (2013), a polpa do maná-cubiu, administrada a ratos Wistar nas doses de 0,250 e 0,375 mg/g peso corporal, foi antimutagênica por análise no sangue periférico e na dose de 0,375 mg/g peso corporal foi antimutagênica por análise na medula óssea. Os carotenoides e os compostos fenólicos presentes na polpa do maná-cubiu apresentaram uma grande eficiência em desativar peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e radicais peroxila, que podem estar relacionados com o efeito antimutagênico observado.

3.3 Bactérias acidoláticas (BAL) e utilização em alimentos

As BAL compreendem um grupo de micro-organismos com diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Estas bactérias são Gram-positivas, catalase-negativas, apresentam a forma de cocos ou bacilos, não formam esporos, são anaeróbias facultativas ou microaerófilas, fastidiosas, ácidos tolerantes, e produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação dos carboidratos (FERREIRA, 2018; SALMINEN; WON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

O grupo das BAL compreendem as bactérias dos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (CROWLEY; MAHONY; SINDEREN, 2013).

A classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros é baseada na morfologia, multiplicação em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido, modo de fermentação da glicose, capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas e tolerância as condições ácidas e básicas (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Essas bactérias podem ser classificadas em mesofílicas (20-30 °C) ou

termofílicas (35-45 °C), conforme a temperatura ótima de desenvolvimento (GIRAFFA, 2012; REIS *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

De acordo com os produtos da fermentação, as bactérias lácticas se dividem em: bactérias homofermentativas e bactérias heterofermentativas. O grupo das bactérias homofermentativas abrange os gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, que utilizam a via Embden-Meyerhof (glicolítica) para transformar os carboidratos, principalmente, em ácido láctico. Por outro lado, as bactérias heterofermentativas utilizam a via da fosfoacetolase para produzir ácido láctico, CO₂, etanol, acetato e citrato a partir da glicose. Os membros desse grupo incluem *Leuconostoc*, *Weissella* e alguns *Lactobacillus* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A maioria das BAL pertence ao gênero *Lactobacillus* e estão presentes na natureza em ambientes ricos em nutrientes, como em produtos lácteos e cárneos, silagens, vegetais fermentados e na microbiota autóctone da cavidade oral, vaginal e trato digestório humano e de animais, onde exercem influência benéfica (CHERIGUENE *et al.*, 2007; FERREIRA, 2018; SALMINEN; WON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

As cepas de BAL são rotineiramente utilizadas na produção de derivados fermentados de origem láctea, cárnea, de vegetais e produtos de panificação. Esse grupo de bactérias auxilia na textura, nas propriedades sensoriais e inibe os micro-organismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos (DATTA; HENRY, 2006).

Algumas BAL possuem a capacidade de restringir a multiplicação de micro-organismos indesejáveis, por competição e/ou produção de agentes antimicrobianos (bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, enzimas e outros). As bacteriocinas, são pequenos peptídeos usados como conservantes naturais de alimentos (ADIMPONG *et al.*, 2012; PAULA *et al.*, 2014).

As BAL são consideradas micro-organismos *generally recognized as safe* (GRAS), sendo assim, as bacteriocinas por elas produzidas podem ser utilizadas com segurança tanto na produção quanto na conservação dos alimentos, em substituição à utilização de conservantes sintéticos (BARMAN; GOSH; MANDAL, 2014). Adicionalmente, o uso de BAL bacteriocinogênicas para fermentação de alimentos ao invés do uso de conservantes químicos atende a demanda de consumidores por produtos alimentícios mais naturais e saudáveis (BORGES *et al.*, 2019).

3.3.1 Bactérias probióticas

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem efeitos específicos e benéficos à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002), sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os gêneros mais utilizados como probióticos.

As substâncias antimicrobianas (ácidos graxos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil, acetaldeído, D-leucina, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, antifúngicos e antibióticos) produzidas pelos micro-organismos probióticos e os ácidos orgânicos (acético, láctico, fórmico) são responsáveis pelos efeitos bactericida ou bacteriostático contra micro-organismos patogênicos (REIS *et al.*, 2012).

Os micro-organismos probióticos modulam a microbiota intestinal, inibem a colonização do intestino por patógenos e a translocação de bactérias patogênicas através da parede intestinal, ou por competição por sítios de adesão ou por nutrientes e, possivelmente, por acidificação do meio e por produção de substâncias antimicrobianas (SAAD *et al.* 2013). Os probióticos se aderem à mucosa epitelial do intestino através de ligações com as proteínas da camada superficial, não deixando espaço livre para adesão dos micro-organismos patogênicos, pois consomem os micronutrientes que seriam utilizados pelos patogênicos, e assim, inibem o seu crescimento (KOTZAMPASSI; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2012). Além disso, alguns probióticos protegem o hospedeiro através da inibição de toxinas produzidas por patógenos. Por exemplo, *Lactobacillus* spp. inibe a expressão da toxina Shiga 2A pela *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica devido à produção de ácidos orgânicos (CAREY *et al.*, 2008). Os probióticos aumentam a barreira da mucosa intestinal por meio de algumas funções indiretas, como a indução da expressão do gene da mucina e subsequente produção de muco, aumento da glicosilação das células epiteliais, produção de IgA secretada (sIgA) e produção de ácidos graxos de cadeia curta (WALLACE *et al.*, 2011).

Os probióticos também podem ser usados nos distúrbios gastrointestinais. Estudos demonstraram que os probióticos podem ser eficazes para melhorar a gastrite causada por *Helicobacter pylori*, diminuir a colonização por *H. pylori*, além de reduzir os efeitos adversos induzidos pelo tratamento de sua erradicação (PATEL; SHAH; PRAJAPATI, 2014).

Certas cepas de bactérias acidoláticas têm capacidade de sintetizar vitaminas do grupo B (tiamina, ácido fólico e riboflavina) e vitamina K, e melhoram o perfil nutricional dos alimentos (LEBLANC *et al.*, 2010; O'CONNOR *et al.*, 2005). A utilização de cepas probióticas produtoras de folato podem conferir proteção eficaz contra inflamação e câncer. A deficiência de folato, está associada às alterações no epitélio do cólon e, normalmente, ocorrem antes do desenvolvimento do câncer (ROSSI; AMARETTI; RAIMONDI, 2011).

Após o consumo, os probióticos precisam sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), devem resistir ao ácido do estômago, aos sais biliares, enzimas gástricas e entéricas (pepsina e pancreatina), além de resistir a outros componentes que possam estar presentes nesse local, dependendo do indivíduo, tais como a presença de medicamentos. Após a passagem pelo TGI, devem aderir e colonizar o epitélio intestinal (RANADHEERA *et al.*, 2012; VINDEROLA *et al.*, 2011). Dentre os fatores prejudiciais para a viabilidade dos probióticos no estômago estão o baixo pH e ação antimicrobiana da pepsina. O pH do estômago varia, geralmente, de 2,5 a 3,5, mas pode ser tão baixo quanto 1,0 ou 2,0, quando há elevada secreção de suco gástrico (MARAGKOUidakis *et al.*, 2006).

Os probióticos devem ser ingeridos diariamente para a obtenção de um efeito contínuo. Por exemplo, o efeito benéfico na composição da microbiota intestinal foi observado com doses de 100 g de alimentos probióticos, contendo 10^8 a 10^9 UFC/g de micro-organismos probióticos (BADARÓ *et al.*, 2008). É reconhecido que o equilíbrio na microbiota intestinal está associado com adequada nutrição e saúde (SILVA, 2017).

Os principais benefícios atribuídos ao consumo de probióticos são: a) modulação da microbiota do trato gastrointestinal: supressão de patógenos endógenos e exógenos, controle de doenças inflamatórias intestinais, redução da incidência de doenças inflamatórias intestinais, diarreia, colite, síndrome do intestino irritável, doença de Crohn e de câncer; b) imunomodulação: aumento da imunidade, alívio dos sintomas alérgicos; c) efeitos metabólicos: anti-obesidade, redução dos níveis de glicose, menor colesterol sérico; d) ação neurológica: redução dos sintomas do autismo; e) melhora na saúde bucal: redução da incidência de gengivite, halitose e cáries (FONTANA *et al.*, 2013; PENNA *et al.*, 2015).

Os probióticos são muito utilizados na elaboração de produtos lácteos fermentados, no entanto, com aumento crescente de pessoas intolerantes à lactose,

vegetarianos, alérgicos entre outros, vem surgindo alternativas do seu uso em outros produtos. Estudos mostraram o desenvolvimento de bebidas de maçã e de soja simbióticas, e evidenciaram a importância de estudos sobre o consumo de BAL benéficas a saúde (BAÚ; GARCIA; IDA, 2015; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005).

Além dos benefícios mais conhecidos, as bactérias probióticas produzem neurotransmissores com potencial de agir sobre o cérebro via nervo vago (SILVA, 2017). Esta comunicação bilateral é conhecida como eixo intestino-cérebro. Sinais do cérebro modificam a função motora, sensorial e secretória do TGI, e por sua vez, sinais do intestino e/ou da microbiota intestinal podem afetar a modulação do comportamento emocional, do humor, do estresse, da cognição e da dor (ALCOCK; MALEY; AKTIPIS, 2014; KATO-KATAOKA *et al.*, 2016). Tillisch *et al.* (2013) observaram por meio de ressonância magnética que as regiões do cérebro que processam as emoções e sensações tiveram sua atividade afetada pela ingestão de iogurte probiótico por 4 semanas.

Um estudo duplo-cego, controlado por placebo, foi desenvolvido para verificar os efeitos de leite fermentado por *L. casei* Shirota (LcS), uma vez ao dia, durante 8 semanas, sobre as respostas do estresse psicológico, fisiológico e físico em estudantes em períodos de exames nacionais. Foram avaliados: estado psico-físico, cortisol na saliva, serotonina fecal, L-triptofano no plasma em 5 diferentes dias de amostragem. Um dia antes do exame, os níveis de cortisol na saliva e triptofano no plasma foram significativamente aumentados somente no grupo placebo. Duas semanas após o exame, o grupo LcS tiveram níveis significativamente maiores de serotonina fecal do que o grupo placebo. Os resultados sugerem que o consumo de leite fermentado por *L. casei* Shirota pode exercer efeito benéfico, prevenindo o aparecimento de sintomas físicos em indivíduos saudáveis expostos a situações de estresse (KATO-KATAOKA *et al.*, 2016).

Além de cepas probióticas comerciais, estudos têm sido realizados para isolar e caracterizar novas cepas. Silva (2010) avaliaram a microbiota de queijo Mussarela fabricado com leite de búfala produzido por dois laticínios, a partir de coletas em diferentes etapas do processo de fabricação, assim como no produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação) recém processado e com 14 e 28 dias de estocagem. As cepas isoladas foram identificadas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA (SILVA, 2010) e caracterizadas quanto à atividade acidificante, capacidade

de utilizarem o citrato, atividade proteolítica e capacidade de produzirem compostos voláteis precursores de aromas. Posteriormente, Silva (2015) avaliaram a dinâmica e a evolução da microbiota láctica, suas características tecnológicas e o potencial de aplicação industrial. As cepas de *Streptococcus thermophilus* SJRP107, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57, *Lactobacillus casei* SJRP38, *Lactobacillus fermentum* SJRP30 e SJRP43, *Enterococcus durans* SJRP29, *Enterococcus faecium* SJRP20 e SJRP65 foram caracterizadas quanto à segurança, potencial tecnológico e probiótico (AMARAL *et al.*, 2017; CASAROTTI *et al.*, 2017; JERONYMO-CENEVIVA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SALOTTI DE SOUZA *et al.*, 2019). Algumas cepas apresentaram resultados promissores de adesão (*in vitro*), produção de bacteriocina (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, PAULA *et al.*, 2014), produção de exopolissacarídeos (*Lactobacillus helveticus* SJRP56, SJRP191, *Streptococcus thermophilus* SJRP02, SJRP03, SJRP107, SJRP109 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49, SJRP50, SJRP51, SJRP57, SJRP76, SJRP149, SJRP181, SANTOS, 2015) e aumento na produção de ácido linoleico conjugado (BORGES *et al.*, 2019). Além disso, algumas cepas apresentaram rápido perfil de acidificação do leite, importante característica para os processos industriais. Estes resultados positivos estimulam a continuidade dos estudos para aplicação dessas cepas na elaboração de produtos fermentados.

3.4 Leite Fermentado

O leite fermentado é oriundo da acidificação do leite por meio da atividade metabólica das BAL, alterando assim as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do produto. De acordo com a Legislação Brasileira, para a fabricação de leite fermentado podem ser utilizados *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias acidoláticas que por sua atividade contribuam para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

Os benefícios apresentados por alimentos contendo cepas de BAL têm contribuído para a elevação da procura e consumo de alimentos funcionais. No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os alimentos funcionais através das resoluções: ANVISA nº 18/99 e 19/99, que preconizam que “o alimento ou o ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos e ou

manutenção geral da saúde no que diz respeito ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução do risco de doenças, não sendo permitidas alegações de saúde que façam referências à cura ou prevenção de doenças” (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b). Esses alimentos devem ser enquadrados e registrados na categoria de alimento com alegações de propriedades funcionais e de saúde ou na categoria de substâncias bioativas e probióticos isolados (BRASIL, 2016).

A ANVISA define alegações de propriedade funcional como sendo “as propriedades que descrevem o papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou outros constituintes (ex. substâncias bioativas e micro-organismos) possuem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. Entre os ingredientes funcionais estão incluídos: ácidos graxos (ω -3), carotenoides (licopeno, luteína e zeaxantina), psílio ou psyllium, quitosano, β -glucano, fitoesteróis, proteína de soja, manitol, xilitol, sorbitol, fibras (inulina, fibras resistentes à dextrina, lactulose, goma guar), polidextrose e micro-organismos probióticos (BRASIL, 2016).

Muitas fibras alimentares apresentam efeito prebiótico, ou seja, estimulam os micro-organismos probióticos. Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um grupo ou uma espécie bacteriana desejáveis no cólon (GIBSON *et al.*, 2017). Os mais conhecidos e estudados prebióticos são amido resistente, inulina, oligofrutose, fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS) (MENDES, 2012).

No segmento dos alimentos funcionais, os produtos lácteos fermentados contendo culturas probióticas e/ou ingredientes prebióticos são considerados os mais importantes. Os produtos lácteos fermentados, tais como os leites fermentados, ganharam importância devido ao seu excelente valor nutricional e à possibilidade de serem adicionados de ingredientes funcionais (BECKER, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2009; SANTOS; BARBOSA; BARBOSA, 2011).

Os leites fermentados possuem elevado potencial para o desenvolvimento de novos produtos, principalmente por estarem associados à saúde, o que vem sendo explorado pelas indústrias de laticínios. Este fator está relacionado com três características: (1) as propriedades tecnológicas da matriz láctea, como permitir a viabilidade funcional de ingredientes adicionados ao produto; (2) a elevada praticidade

de consumo dos derivados lácteos e (3) a relação que os consumidores fazem dos produtos lácteos com a saudabilidade (COSTA *et al.*, 2013).

As principais características de qualidade sensorial dos leites fermentados incluem textura, sabor e aroma (POURAHMAD; ASSADI, 2005). O leite fermentado é caracterizado como um gel suave e viscoso com sabor ácido acentuado característico. Este produto é rico em vitaminas e minerais e excelente fonte de cálcio e proteínas. Além dos benefícios nutricionais, apresenta benefícios à saúde, como alívio da intolerância à lactose. A intolerância a lactose ocorre devido à ausência da enzima β -galactosidase no intestino que impossibilita a degradação da lactose presente em produtos lácteos. Muitas BAL presentes em leites fermentados também produzem a enzima β -galactosidase, e hidrolisam a lactose presente no leite em glicose e galactose, facilitando sua digestão e beneficiando assim as pessoas com intolerância à lactose (PENNA; GURRAM; BARBOSA-CÁNOVAS, 2007; SHAH, 2007; WARD *et al.*, 2006). Os efeitos benéficos dos leites fermentados podem ser potencializados pelo uso de micro-organismos probióticos em sua formulação (ASHRAF; SHAH, 2011; CHENG, 2010).

A adição de polpa de frutas no leite fermentado aumenta o valor nutricional do produto e melhora suas características sensoriais. Além disso, estes produtos podem ser incluídos na classe dos alimentos saudáveis, pois promovem benefícios à saúde, proporcionados pelo fornecimento de antioxidantes e fibras presente nas frutas (O'RELL; CHANDAN, 2006). As frutas nativas estão sendo pesquisadas, por serem fontes de compostos bioativos, elevada capacidade antioxidante e elevados teores de compostos fenólicos (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Recentemente, foi testado o efeito de polpas de buriti e de maracujá no crescimento de BAL e aplicação das polpas em leite fermentado e acidificado (BORGONOV, 2018). Os resultados foram muito promissores, incentivando a realização de estudos adicionais, utilizando outras frutas e outras espécies de BAL para obter produtos lácteos funcionais.

Neste sentido, a composição nutricional e as características sensoriais do maná-cubiu favorecem o desenvolvimento de novos produtos alimentícios com boa aceitação dos consumidores. Uma possibilidade é a adição da polpa de maná-cubiu em leite fermentado por bactérias lácticas probióticas, o que irá conferir sabor, aroma e cor aos produtos, além de aumentar o valor nutricional e diversificar a gama de produtos disponíveis no mercado.

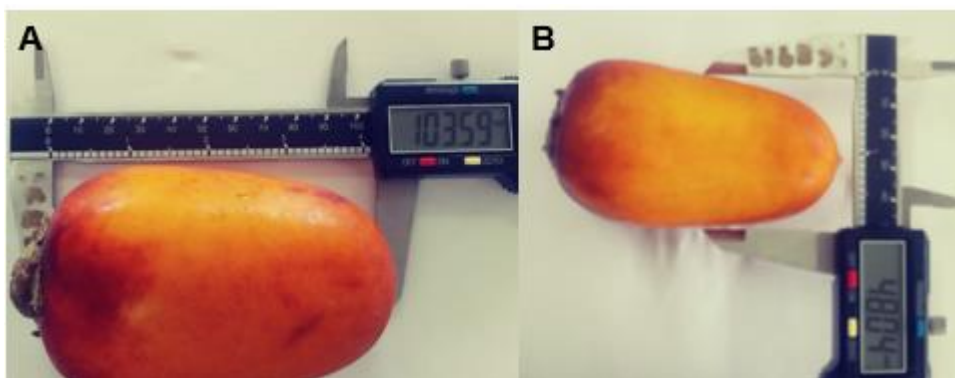
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e caracterização física do fruto maná-cubiu

Os frutos de maná-cubiu foram adquiridos na CEAGESP/SP, em dois lotes, obtidos em épocas do ano distintas (Janeiro e Julho), totalizando 8,1 kg de frutos. Para caracterização física, todos os frutos foram pesados em balança semi-analítica (Gehaka BG 2000, São Paulo, Brasil). Foram tomadas as medidas de comprimento e diâmetro máximo, com auxílio de paquímetro digital (Marberg, China) com precisão de 0,01 mm, conforme a Figura 5.

Para a avaliação do rendimento das partes comestíveis, foram selecionados 50 frutos, aleatoriamente, descascados e cortados manualmente, sendo separada a polpa das sementes, partes injuriadas, a casca e os pedúnculos. Para o cálculo do rendimento utilizou-se balança semi-analítica (Gehaka BG 2000, São Paulo, Brasil).

Figura 5. Comprimento (A) e largura (B) do fruto maná-cubiu.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Avaliação das condições para conservação da polpa de maná-cubiu

Os frutos foram lavados em água corrente e submersos em solução aquosa de hipoclorito de sódio (NaClO) a 10% em temperatura ambiente, por 10 min. Após a sanitização os frutos foram enxaguados em água corrente e colocados em peneiras para escorrer o excesso de água. Foram retiradas as cascas e pedúnculos manualmente; em seguida, os frutos foram imersos em uma solução de ácido cítrico (pH 4,0) por 1 min.

Para a obtenção e conservação da polpa, os frutos foram triturados, adicionados de ácido cítrico, pasteurizados em multiprocessador (Thermomix, Vorwerk, Cloyes-surle-Loir, França), conforme o tratamento (Tabela 1). A seguir, a

polpa foi passada em tamis de inox de 1,68 mm (ABNT 12) para a retirada das sementes, embalada a vácuo em sacos de polietileno, inserida em embalagens escuras e armazenada em ultrafreezer a -80 °C até o momento das análises.

Para avaliar as condições de conservação da polpa, foram realizados ensaios, segundo um planejamento fatorial de dois níveis com ponto central, composto por 7 experimentos. Os níveis das variações estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz de ensaios do planejamento fatorial em dois níveis, com as variáveis nas unidades codificadas e originais para tratamento da polpa de maná-cubiu.

Experimentos	Variáveis codificadas		Variáveis Originais	
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)
1	-	-	5,0	0,5
2	+	-	10,0	0,5
3	-	+	5,0	1,0
4	+	+	10,0	1,0
5	0	0	7,5	0,75
6	0	0	7,5	0,75
7	0	0	7,5	0,75

X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%), Polpa sem tratamento e Fruto *in natura* (fruto inteiro), processados no dia da análise.

O efeito das variáveis independentes: tempo de tratamento térmico a 70 °C (x₁) e teor de ácido cítrico (x₂) foi estudado nas características da polpa de maná-cubiu (pH, acidez, compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante). A temperatura de 70 °C, os tempos de tratamento térmico e os teores de ácido cítrico foram baseados em dados disponíveis na literatura (FUJITA; VIEITES; DAIUTO, 2013). Para efeito de comparação, a fruta *in natura* triturada (com cascas e sementes) e a polpa sem tratamento também foram avaliadas.

4.3 Composição centesimal da polpa de maná-cubiu

A determinação da composição centesimal da polpa de maná-cubiu foi realizada em triplicata. O teor do extrato seco total (EST) foi determinado em estufa de circulação de ar forçado (Marconi, MA035/5NI, Piracicaba, Brasil) 65 °C até massa

constante. O teor de lipídeos e o perfil de ácidos graxos foram determinados por método de Soxhlet por extração direta, por 8 horas (IAL, 2008). O processo de esterificação dos ácidos graxos foi realizado de acordo com AOAC (2010). O teor de nitrogênio (% N) foi determinado pelo método micro Kjeldahl (Solab, SL-74, Piracicaba, Brasil). O teor de proteína bruta foi calculado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio por 6,25. O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C até massa constante (IAL, 2008). O teor de fibra alimentar solúveis e insolúveis foi realizado pelo método enzimático gravimétrico (AOAC, 2010). A determinação de carboidratos foi realizada por diferença, segundo Resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003 a).

4.4 Sólidos solúveis totais (°Brix), potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável

O conteúdo de sólidos solúveis totais foi determinado por refratometria, utilizando um refratômetro portátil (Akso, RHB 32 ATC, São Leopoldo, Brasil). Os valores de pH e de acidez dos frutos de maná-cubiu *in natura* foram determinados no momento de obtenção da polpa. A determinação do valor de pH foi realizada em potenciômetro digital (IAL, 2008). A acidez titulável total (ATT) foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M e fenolftaleína como indicador (IAL, 2008). O resultado foi expresso em % de ácido cítrico, conforme Equação 1.

$$ATT = \frac{V * M * PM}{10 * m * n} \quad \text{Equação 1}$$

em que o “V” representa o volume gasto na titulação expresso em mL, “M” a molaridade da solução de hidróxido de sódio (M), “PM” é massa molecular do ácido cítrico (g), “m” é a massa de polpa (g) e “n” é o número de hidrogênios ionizáveis.

O valor energético (VE, em kcal/100 g) foi calculado a partir dos teores de proteínas (P), lipídeos (L) e carboidratos (C), considerando 4 kcal/g para proteínas e carboidratos e 9 kcal/g para lipídeos (BRASIL, 2003 b).

4.5 Colorimetria

A cor da polpa de maná-cubiu foi avaliada em espectrofotômetro (ColorFlex, Hunterlab, Reston, VA, EUA), equipado com iluminante D65/10°, e calibrado utilizando padrões de cor preta e branca. Os resultados foram expressos pelo sistema *CIELAB* (L^*, a^*, b^*), em que o valor de L^* mede a luminosidade ou a porcentagem de reflectância, variando de 0 (branco) para 100 (preto). O valor de a^* , situado no eixo horizontal, mede a variação entre a cor verde ($-a^*$) e a vermelha ($+a^*$), o valor de b^* , a variação entre o azul ($-b^*$) e o amarelo ($+b^*$) e o valor de H mede o ângulo Hue ou a tonalidade (HUNTERLAB, 1998).

4.6 Compostos bioativos e atividade antioxidante

4.6.1 Obtenção do extrato e determinação dos compostos fenólicos

Em testes preliminares foi avaliada a capacidade de diferentes solventes para a extração dos compostos fenólicos (ANEXO A).

Para a extração, foi pesado aproximadamente 2,5 g da polpa de mana cubiu em tubo de falcon, em seguida adicionado 10 mL de metanol 50%, homogeneizado, e colocado em repouso por uma hora, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, a mistura de polpa e solvente foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos em centrífuga (THERMO modelo SL 8, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o resíduo sólido foi submetido a nova extração com acetona 70%. O sobrenadante da segunda extração foi recolhido no mesmo balão volumétrico e completado o volume com água Mili-Q. A composição final obtida após avolumação foi 40% de metanol, 40% de acetona e 20% de água Mili-Q.

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada, em triplicata, pelo método de Folin-Ciocalteu, modificado por Ramful e Tarnus (2011), aos 1, 20 e 40 dias de estocagem da polpa. Resumidamente, 250 μ L do extrato foi adicionado a 3,5 mL de água MiliQ em tubo de ensaio e misturados com 250 μ L de reagente fenólico de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, 1000 μ L de carbonato de sódio 20% (m/v) foi adicionado a mistura, agitado em vortex (Nova Instruments, Piracicaba, Brasil) e incubado em banho maria (Fisatom, São Paulo, Brasil) a 40 °C por 40 min ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em 685 nm em espectrofotômetro UV/VIS modelo Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). O teor de compostos

fenólicos totais nas polpas foi calculado por meio de curva analítica, preparada com solução de ácido gálico (5,0 a 100 mg/L). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de polpa.

A retenção dos compostos fenólicos (%) foi calculada pela diferença entre o teor de compostos fenólicos no final da estocagem e o teor apresentado no início da estocagem em relação ao teor apresentado no início da estocagem.

4.6.2 Obtenção do extrato e determinação de carotenoides

O teor de carotenoides totais (luteína e β -caroteno) foi avaliado, em triplicata, por espectrofotometria segundo metodologia descrita por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), com modificações. A amostra foi pesada (10 g), colocada em tubos e acrescentada de acetona até cobrir toda a amostra. Em seguida, a mistura foi agitada em vortex (Nova Instruments, Piracicaba, Brasil) e colocada ao abrigo da luz por 10 min; transcorrido o tempo, a suspensão foi filtrada em funil de placa sinterizada (n° 4) acoplado a kitassato e bomba a vácuo. O filtrado foi transferido para funil de decantação contendo éter de petróleo. O processo de extração foi repetido até exaustão total da amostra (amostra sem coloração). Ao funil de separação foi adicionado lentamente pelas paredes 250 mL de água milli-Q, o sistema foi deixado em repouso por uma noite ao abrigo da luz. Transcorrido o tempo, foi feita a retirada da fase inferior (água-acetona - parte incolor) do funil de separação e adição sucessiva de 300 mL de água milli-Q, até a total transferência dos carotenoides para o éter de petróleo. O extrato em éter de petróleo foi recolhido, com auxílio de um funil contendo algodão coberto com sulfato de sódio (agente dessecante), em balão volumétrico de 25 mL; o volume foi completado com éter de petróleo. As leituras de luteína e β -caroteno foram realizadas nos comprimentos de onda 445 e 450 nm, respectivamente. As quantificações dos teores de β -caroteno e luteína na polpa de maná-cubiu foram determinadas por meio da equação 2, e os resultados expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de polpa.

$$\text{caratenoides} = \frac{Abs_{am} * Vol * 10^4}{Abs_{ep} * p} \quad \text{Equação 2}$$

em que “Abs_{am}” é absorbância da amostra, “vol” é o volume total do extrato (25 mL), “Abs_{ep}” é o coeficiente de absorção do β -caroteno (2592) e da luteína (2550) em éter de petróleo e “p” é o peso da amostra.

A retenção dos carotenoides (%) foi calculada pela diferença entre o teor de carotenoides no final da estocagem e o teor apresentado no início da estocagem em relação ao teor apresentado no início da estocagem.

4.6.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•

A atividade antioxidante foi avaliada, em triplicata, medindo a eficácia de inibir o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), seguindo o método de Rufino *et al.* (2007), com modificações, utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda 515 nm. A avaliação da capacidade de inibição via DPPH• consistiu em misturar 100 μ L do extrato (obtido conforme item 4.6.1) em 3,9 mL de radical DPPH• (0,06 mM), posteriormente, a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso, ao abrigo da luz por 30 min. Foram realizadas 3 diluições (100, 50, 20%) a fim de se obter 3 diferentes concentrações do extrato para maior precisão do método. A capacidade de inibição do extrato de maná-cubiu frente ao DPPH• foi avaliada por meio de curva analítica, preparada com o reagente 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (trolox) na faixa de linearidade de 50 a 1200 μ mol (50, 200, 400, 800, 1000 e 1200 μ mol), previamente preparadas a partir de solução padrão de 2000 μ mol de trolox. O resultado foi expresso em capacidade antioxidante equivalente ao trolox em μ mol trolox/g de polpa.

4.6.4 Determinação da atividade antioxidante método de redução do ferro (FRAP)

O ensaio da atividade antioxidante pelo método FRAP mede a capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , em meio ácido presente no complexo de Fe^{3+} -TPTZ [2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina], e foi realizado de acordo com Rufino *et al.* (2006), com modificações. Uma alíquota de 90 μ L do extrato (obtido conforme item 4.6.1) foi misturada com 270 μ L de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho maria a 37 °C por 30 min, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm, com a utilização da solução FRAP como branco para calibração do espectrofotômetro. O resultado foi

expresso em atividade antioxidante, expressa em $\mu\text{mol trolox/g}$ de polpa, utilizando uma curva de calibração preparada com solução padrão de trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), na faixa de linearidade de 50 a 1200 μmol (50, 200, 400, 800, 1000 e 1200 μmol).

4.6.5 Análise estatística dos resultados da caracterização da polpa de maná-cubiu

A partir dos resultados da caracterização das polpas do fruto maná-cubiu foi realizada a análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada usando o teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Minitab 17.

Para os dados de compostos bioativos e atividade antioxidante foi realizada a análise dos componentes principais (ACP), a fim de verificar o agrupamento das características da polpa de maná-cubiu, e assim como simular a relação entre as variáveis (VÍTOLO *et al.*, 2012).

4.7 Avaliação da viabilidade de BAL na presença de polpa de maná-cubiu

As culturas de BAL (Tabela 2) utilizadas pertencem ao banco de culturas do Laboratório de Leite e Derivados, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus São José de Rio Preto. As cepas foram previamente identificadas e caracterizadas por Silva (2010; 2015) e avaliadas como potencialmente probióticas (CASAROTTI *et al.*, 2017; JERONYMO-CENEVIVA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SALOTTI DE SOUZA *et al.*, 2019; SANTOS, 2015). As condições de cultivo estão descritas na Tabela 2. As culturas comerciais *Lactobacillus rhamnosus* (GG ATCC 53103, Chr. Hansen, Dinamarca) e *Streptococcus thermophilus* ST 080 (Cryofast ST 080, Sacco, Itália) foram usadas como referências.

Para investigar o efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade das BAL foram utilizados os meios M17 ou MRS com glicose (controle) e M17 ou MRS + polpa de maná-cubiu na concentração de 10 g/L ou 30 g/L. O meio MRS foi preparado de acordo com a seguinte formulação: peptona de caseína (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), tween 80 (1 mL/L), citrato de amônio bibásico (2 g/L), acetato de sódio (5 g/L), sulfato de magnésio (0,1 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L), fosfato dipotássico (2

g/L) e ágar (14 g/L). O meio M17 foi preparado de acordo com a seguinte formulação: peptona de caseína (2,5 g/L), peptona de soja (5,0 g/L), extrato de levedura (2,5 g/L), β -glicerofosfato de sódio (19,0 g/L), sulfato de magnésio (0,25 g/L), ácido ascórbico (0,50 g/L) e ágar (14 g/L). Os meios M17 ou MRS adicionado de glicose (10 g/L) foram utilizados para comparação com o meio M17 ou MRS adicionados de polpa de fruta. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C durante 20 min.

Tabela 2. Condições de cultivo das BAL que serão utilizadas na seleção.

Espécies	Cepas	Meio de cultivo	Condições de incubação
<i>S. thermophilus</i>	ST 080	M17	42 °C, aerobiose
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	SJRP57	MRS	42 °C, anaerobiose
<i>L. casei</i>	SJRP38	MRS	37 °C, anaerobiose
<i>L. rhamnosus</i> GG	ATCC 53103	MRS	37 °C, anaerobiose
<i>L. fermentum</i>	SJRP30, SJRP43	MRS	42 °C, anaerobiose
<i>L. plantarum</i>	ST8Sh	MRS	37 °C, anaerobiose
<i>E. durans</i>	SJRP29	MRS	37 °C, aerobiose
<i>E. faecium</i>	SJRP20, SJRP65	MRS	37 °C, aerobiose

M17 - meio de cultivo específico para BAL na forma de cocos, tal como *Streptococcus* sp.

MRS – meio de cultivo específico para bactérias acidoláticas.

Antes dos ensaios, as cepas de BAL (Tabela 2) foram cultivadas duas vezes em meio M17 ou MRS (Difco), conforme a cepa, nas condições específicas de cada cepa por 24 horas. Em seguida, as cepas foram submetidas à centrifugação (5000 x g, 5 °C, 5 min), lavadas duas vezes com tampão fosfato, e suspensas (1%, v/v) nos meios de cultivo em temperatura específica para cada cepa. A viabilidade das cepas foi avaliada por contagem em placa (UFC) nos tempos 0, 2, 4, 8, 12 e 24 h após a inoculação. A viabilidade no meio correspondente ao controle negativo (MRS ou M17 sem glicose e sem polpa) foi subtraído dos resultados de crescimento nos demais meios, servindo como linha basal do crescimento (MÄKELÄINEN *et al.*, 2010). Os experimentos foram realizados em duplicada.

As cepas de BAL que apresentaram a maior viabilidade na presença da polpa de maná-cubiu (10 ou 30 g/L) foram selecionadas para a elaboração do leite

fermentado. Nesta etapa, também foi avaliada o uso da cultura pura ou em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* ST 080.

4.8 Preparo do leite fermentado e caracterização físico – química

4.8.1 Preparo do leite em pó reconstituído

O leite em pó desnatado foi reconstituído em água para obter-se 14% de sólidos totais. O leite foi agitado até completa dissolução do pó. Para a caracterização do leite em pó reconstituído, a acidez titulável foi quantificada por titulação ácido-alcalimétrica usando-se a solução de NaOH 0,1 mol/L e fenolftaleína como indicador (IAL, 2008). Os resultados foram expressos em % de ácido láctico. Os teores de lipídeos, proteína, sólidos totais (ST) e sólidos não gordurosos (SNG) foram determinados através da aplicação de ultrassom nas amostras em equipamento Ekomilk-M (Bulteh 2000 Ltda., Stara Zagora, Bulgária).

4.8.2 Preparo do leite fermentado

O leite reconstituído foi aquecido até 90 °C e mantido por 10 min, com o auxílio de um processador e resfriado até a temperatura de inoculação, subdividido em iguais porções e distribuído em frascos de vidro estéreis, para uso nos tratamentos. Para avaliar o efeito da BAL selecionada foram preparados 2 tratamentos: Leite fermentado controle, sem adição de polpa de maná-cubiu, e leite fermentado com adição de 3% de polpa de maná-cubiu.

Para o preparo do leite fermentado foi feita a adição da BAL selecionada (10^8 UFC/mL) ao leite reconstituído tratado, na forma pura ou em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*, previamente ativadas. Os frascos foram incubados em banho termostatizado com circulação de água. Durante a fermentação, o pH foi medido continuamente, a partir da inoculação da cultura láctica, até atingir o pH 4,6. Após o término da fermentação, foi feito o resfriamento inicial do produto, em banho de água e gelo, até 20 °C, e a quebra do coágulo por agitação manual durante 2 min, de forma padronizada para todos os tratamentos, seguido do resfriamento final até 5 °C. Os produtos fermentados foram distribuídos em frascos estéreis e armazenados à temperatura de 4 °C, até o momento das análises. O processamento foi repetido duas vezes (n=2).

4.8.3 Caracterização físico-química do leite fermentado

A composição centesimal do leite fermentado foi determinada em triplicata. O teor do extrato seco total (EST) foi determinado pela secagem em estufa a vácuo por 24 horas a 70 °C, conforme recomendado pela *American Public Health Association* (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985). O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de micro Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (AOAC, 2010). O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C (IAL, 2008). O teor de gordura foi determinado utilizando-se o método de Gerber (CASE; BRADLEY JUNIOR; WILLIAMS, 1985). O teor de carboidratos foi determinado por diferença.

As análises de acidez titulável, pH, capacidade de retenção de água (CRA) e sinérese, nos dias 1, 14 e 28 dias após a fabricação do leite fermentado foram realizadas em triplicata. A acidez titulável foi quantificada conforme descrita para o leite reconstituído. O pH foi determinado utilizando-se pHmetro digital, com eletrodo de vidro combinado (IAL, 2008). A CRA foi determinada em 10 g da amostra submetida à centrifugação a 15000 x g por 15 min a 20 °C. O sobrenadante foi separado e pesado. A CRA foi determinada pela Equação 3 (PENNA; GURRAM; BARBOSA-CÁNOVAS, 2007):

$$\text{CRA (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Peso do soro após centrifugação}}{\text{Peso do iogurte}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Para a determinação da sinérese, 10 mL de leite fermentado foram colocados sobre uma peneira de aço inox (mesh 120), acoplada a um funil (MORETTI, 2009). A sinérese foi calculada pelo volume de soro liberado de forma espontânea do produto após incubação por 2 h a 6 °C e expressa em porcentagem de sinérese.

4.8.4 Caracterização de compostos bioativos no leite fermentado

A extração dos compostos bioativos do leite fermentado, assim como as análises de teor de carotenoides totais, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH• e FRAP) foram realizados de acordo com a metodologia descrita anteriormente (itens 4.6.3 e 4.6.4) para a caracterização da polpa de maná-cubiu, modificando apenas a quantidade de amostra. Testes preliminares foram realizados para se determinar a melhor relação amostra/solvente. Foi definida a relação 1:1 entre

amostra e solvente (12,5 g de leite fermentado e 12,5 mL de solução de solvente), composto por metanol 50% e acetona 70%.

4.9. Viabilidade celular das BAL em leite fermentado

A análise de viabilidade celular das BAL em leite fermentado foi realizada por diluição decimal seriada, em triplicata, nos tempos 1, 14 e 28 dias após a fabricação dos produtos. Uma alíquota de 100 µL de leite fermentado foi transferida para tubo contendo 900 µL de solução salina a 0,85%. A mistura foi agitada e a suspensão foi submetida a diluições seriadas de 10 µL, até 10^{-8} utilizando-se o mesmo diluente. Para a contagem total de BAL foi utilizado ágar MRS modificado ou ágar M17, dependendo da cepa, e foi transferido 10 µL de cada diluição para placas de Petri. As placas foram incubadas em condições específicas para cada cepa durante o período de 24 a 48 h (SOLIERI *et al.*, 2014).

Para a contagem de *L. plantarum* ST8Sh no leite fermentado, em co-cultura com *S. thermophilus* ST 080, foi utilizado o meio MRS + 200 µg/mL de canamicina (MRSC) para inibição do *S. thermophilus* ST 080. A contagem de *S. thermophilus* ST 080 foi dada pela diferença entre a contagem total em MRS – contagem em MRSC, de forma semelhante à realizada por Borges *et al.* (2019) para contagem de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55.

4.10 Análise estatística dos resultados do leite fermentado

A partir dos resultados da caracterização do leite fermentado adicionado de polpa de maná-cubiu foi realizada a análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada usando o teste de Tukey, considerando se um nível de significância de 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Minitab 17. No teste de Tukey foram considerados os fatores: adição da polpa de maná-cubiu, cultura utilizada e tempo de armazenamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização física do fruto maná-cubiu

Os frutos apresentaram peso médio de $143,97 \pm 28,88$ g, comprimento médio de $8,76 \pm 0,85$ cm e diâmetro médio de $5,19 \pm 0,46$ cm, demonstrando grande variação. Esta diferença de peso, comprimento e diâmetro podem estar relacionada com incidência solar, umidade e presença de nutrientes no local de plantio, entre outros fatores. Sereno (2017) relatou peso médio de $83,91 \pm 20,47$ g, comprimento $5,49 \pm 0,20$ cm e diâmetro $5,46 \pm 0,03$ cm do fruto maná-cubiu do Município de Antonina, PR.

Para o cálculo de rendimento dos frutos em polpa foram selecionados 50 frutos, perfazendo 8,100 kg; durante a etapa de seleção e preparo foram descartados 1,250 kg, correspondentes a frutas deterioradas, cascas, sementes e pedúnculos. Assim, o rendimento da matéria-prima comestível (6,850 kg) correspondeu a 84,56% do inicial.

5.2 Composição centesimal e valor energético do fruto maná-cubiu

A composição centesimal do fruto (em base úmida) foi determinada no primeiro dia de armazenamento (Tabela 3). O baixo teor de carboidratos (5,26%), de lipídeos e de proteínas, e consequentemente, baixo valor energético (26,06 kcal/100 g) dos frutos de maná-cubiu são características típicas desse fruto. O maná-cubiu é considerado um fruto dietético e pode ser indicado para indivíduos com sobrepeso e obesidade, e para àqueles que tem restrição energética (MAIA *et al.*, 2015).

Os teores de umidade (91,51%) e de carboidratos (4,66%) do fruto maná-cubiu da região de Viçosa, MG, encontrados por Barbosa *et al.* (2006) foram menores que os encontrados neste trabalho, 93,44% e 5,26% para umidade e carboidratos, respectivamente, entretanto, os teores de lipídeos (2,23%), proteínas (0,82%) e cinzas (0,77%) foram superiores. Souza (2008) obteve $72,1 \pm 1,5\%$ de umidade na polpa de maná-cubiu da região de Manaus, AM, inferior ao observado neste trabalho (Tabela 3). Estas variações são normais, uma vez que a composição centesimal dos frutos é dependente de vários fatores, tais como a variedade, espécie, local de cultivo, época do ano, etc (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Tabela 3. Caracterização química do fruto maná-cubiu

Determinação	Resultados
Umidade (%)	93,44 ± 0,21
Lipídeos (%)	0,34 ± 0,04
Proteínas (%)	0,49 ± 0,03
Cinzas (%)	0,47 ± 0,05
Carboidratos (%)	5,26 ± 0,29
Valor Energético kcal/100 g	26,06 ± 0,93

Yuyama *et al.* (2007) analisaram 8 etanoviedades de frutos do maná-cubiu e obtiveram 88,4 a 91,7% de umidade, 0,5 a 0,7% de cinzas, 0,4 a 0,7% de proteínas, 0,3 a 1,8% de lipídeos, 4,5 a 7,1% de carboidratos, e 24,7 a 43,8 kcal/100 g de valor energético, similares aos observados no presente trabalho.

5.3 Valor de pH, acidez e sólidos solúveis da polpa de maná-cubiu

Os valores de pH diminuíram e a acidez aumentou durante o tempo de armazenamento da polpa de maná-cubiu (Tabela 4). Fujita (2011) analisou os frutos de maná-cubiu durante 20 dias de armazenamento e obteve valores de pH na faixa de 3,18 a 3,34, semelhante aos valores encontrados neste trabalho.

Houve aumento dos teores de sólidos solúveis durante o tempo de armazenamento da polpa de maná-cubiu (Tabela 5). As amostras 1 e 4 não apresentaram diferença significativa durante o armazenamento, enquanto as amostras 2 e 5 não apresentaram diferenças significativas de sólidos solúveis no período 1 a 20 dias de armazenamento. Segundo Kluge *et al.* (2002) e Chitarra e Chitarra (2005), o aumento do teor de sólidos solúveis no decorrer do armazenamento dos frutos in natura é devido à biossíntese ou ao aumento de açúcares redutores simples.

A relação entre sólidos solúveis e acidez é baixa, isso indica que o fruto possui baixo teor de açúcar (Tabela 5). No trabalho desenvolvido por Fujita (2011), a relação de sólidos solúveis foi variável, com valores de 5,67 a 7,13%, superiores aos encontrados neste trabalho, provavelmente por diferenças na maturação.

Tabela 4. Valores de pH e de acidez (%) da polpa de maná-cubiu durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão.

Amostra	Tratamentos		pH			Acidez (%)		
	X ₁	X ₂	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	1	20	40	1	20	40
1	5,0	0,5	3,37 ± 0,05 ^a	3,32 ± 0,03 ^a	3,28 ± 0,06 ^a	2,10 ± 0,03 ^c	2,15 ± 0,04 ^b	2,83 ± 0,59 ^a
2	10,0	0,5	3,47 ± 0,0 ^a	3,41 ± 0,03 ^a	3,33 ± 0,00 ^b	1,73 ± 0,00 ^b	1,73 ± 0,01 ^b	1,94 ± 0,04 ^a
3	5,0	1,0	3,40 ± 0,00 ^a	3,30 ± 0,03 ^b	3,26 ± 0,01 ^c	2,22 ± 0,01 ^b	2,24 ± 0,01 ^b	2,45 ± 0,05 ^a
4	10,0	1,0	3,40 ± 0,00 ^a	3,29 ± 0,01 ^b	3,22 ± 0,01 ^c	2,21 ± 0,02 ^b	2,24 ± 0,00 ^b	2,64 ± 0,13 ^a
5	7,5	0,75	3,47 ± 0,05 ^a	3,24 ± 0,03 ^b	3,18 ± 0,01 ^b	2,27 ± 0,04 ^a	2,40 ± 0,19 ^a	2,48 ± 0,01 ^a
6	7,5	0,75	3,37 ± 0,06 ^a	3,33 ± 0,03 ^a	3,25 ± 0,01 ^b	2,18 ± 0,04 ^a	2,23 ± 0,04 ^a	2,25 ± 0,02 ^a
7	7,5	0,75	3,75 ± 0,07 ^a	3,37 ± 0,06 ^b	3,26 ± 0,02 ^b	2,13 ± 0,01 ^b	2,20 ± 0,03 ^a	2,01 ± 0,03 ^c
Polpa sem tratamento			3,37 ± 0,05 ^a	3,33 ± 0,03 ^b	3,25 ± 0,01 ^b	2,18 ± 0,04 ^a	2,18 ± 0,04 ^a	2,23 ± 0,04 ^a

X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%). ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, para a mesma avaliação, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Tabela 5. Sólidos solúveis (%) e relação entre sólidos solúveis (%) e acidez (%) da polpa de maná-cubiu durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão.

Amostra	Tratamentos		Sólidos Solúveis			Sólidos Solúveis/Acidez		
	X ₁	X ₂	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	1	20	40	1	20	40
1	5,0	0,5	6,80 ± 0,10 ^a	6,97 ± 0,06 ^a	6,97 ± 0,06 ^a	2,40	3,24	3,32
2	10,0	0,5	6,10 ± 0,10 ^b	6,13 ± 0,06 ^b	6,53 ± 0,12 ^a	3,14	3,54	3,77
3	5,0	1,0	7,10 ± 0,17 ^c	7,40 ± 0,26 ^b	7,87 ± 0,12 ^a	2,90	3,30	3,55
4	10,0	1,0	7,23 ± 0,05 ^a	7,23 ± 0,06 ^a	7,27 ± 0,12 ^a	2,74	3,23	3,29
5	7,5	0,75	7,00 ± 0,00 ^b	7,17 ± 0,12 ^b	7,73 ± 0,12 ^a	2,82	2,99	3,41
6	7,5	0,75	7,13 ± 0,15 ^c	7,47 ± 0,12 ^b	7,93 ± 0,12 ^a	3,17	3,35	3,64
7	7,5	0,75	6,97 ± 0,06 ^b	7,47 ± 0,12 ^a	7,27 ± 0,12 ^a	3,17	3,72	3,41
Polpa sem tratamento			7,13 ± 0,15 ^c	7,47 ± 0,12 ^b	7,93 ± 0,12 ^a	3,17	3,35	3,64

X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%). ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05)

Os sólidos solúveis totais são dependentes do índice de maturação dos frutos e indicam a quantidade de substâncias que se encontram dissolvidas no suco, sendo constituídos em sua maioria por açúcares (CHAVES *et al.*, 2004).

A relação entre sólidos solúveis e acidez é um indicativo usado para estabelecer o índice de colheita de alguns frutos, indicando a doçura dos frutos para seleção de uma melhor matéria-prima. Quanto maior for a razão entre sólidos solúveis e acidez, mais doces são os frutos. Durante o amadurecimento ocorre a degradação dos ácidos orgânicos, pois há um aumento da concentração de enzimas como as hidrolases (amilases, celulasas, pectinases), peroxidases e catalase, reduzindo assim a adstringência e o gosto ácido do fruto (PEREIRA *et al.*, 2006).

No controle de qualidade de polpas de fruta, parâmetros como pH, acidez titulável, sólidos solúveis, açúcares redutores e totais, e vitamina C são importantes para a padronização do produto e análise de possíveis alterações ocorridas durante o processamento e/ou o armazenamento (CASTRO *et al.*, 2015). O pH e a acidez podem influenciar na conservação da polpa, enquanto o teor de sólidos solúveis é uma medida indireta do teor de açúcar inerente ao tipo de fruto e pode variar tanto em razão de fatores climáticos, como em razão da adição eventual de água durante o processamento (LIRA JÚNIOR *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009).

5.4 Colorimetria

A polpa sem tratamento perdeu luminosidade (escureceu) ao longo do armazenamento, pela ausência de ácido cítrico e presença de enzimas. Também houve aumento dos parâmetros a^* e b^* , e redução do ângulo *hue* (Tabela 6). Esses dados demonstram perda da cor vermelha, aumento da cor amarela e predominância de coloração laranja. O fruto maná-cubiu possui as enzimas pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG), polifenoloxidase (PPFO) e peroxidase (POD). Se estas enzimas não foram totalmente inativadas com os tratamentos utilizados, pode haver escurecimento da polpa. O controle da atividade enzimática do maná-cubiu pode ser obtido pela utilização de baixas temperaturas, principalmente por se tratar de frutos com comportamento climatérico (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Tabela 6. Parâmetros de cor (L, a*, b* e h*) das polpas de maná-cubiu durante o armazenamento. Resultados expressam médias seguidas de desvio padrão.

Amostra	Tratamentos		L*			a*		
	X ₁	X ₂	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	1	20	40	1	20	40
1	5,0	0,5	55,69 ± 0,00 ^c	65,77 ± 0,01 ^b	66,25 ± 0,02 ^a	9,63 ± 0,03 ^a	1,05 ± 0,01 ^c	2,04 ± 0,01 ^b
2	10,0	0,5	55,97 ± 0,02 ^c	68,12 ± 0,00 ^a	65,90 ± 0,01 ^b	9,16 ± 0,05 ^a	3,99 ± 0,02 ^b	1,34 ± 0,04 ^c
3	5,0	1,0	69,76 ± 0,02 ^a	68,53 ± 0,02 ^b	68,03 ± 0,03 ^c	0,59 ± 0,01 ^c	2,89 ± 0,02 ^a	2,66 ± 0,08 ^b
4	10,0	1,0	69,69 ± 0,02 ^c	71,60 ± 0,00 ^a	70,12 ± 0,06 ^b	0,90 ± 0,03 ^a	0,91 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,05 ^b
5	7,5	0,75	68,65 ± 0,12 ^c	71,84 ± 0,03 ^a	71,04 ± 0,04 ^b	0,78 ± 0,06 ^c	2,59 ± 0,02 ^a	1,81 ± 0,04 ^b
6	7,5	0,75	68,18 ± 0,03 ^a	68,21 ± 0,02 ^a	66,79 ± 0,03 ^b	3,28 ± 0,05 ^b	3,40 ± 0,01 ^a	2,00 ± 0,02 ^c
7	7,5	0,75	68,04 ± 0,02 ^b	68,23 ± 0,02 ^a	66,27 ± 0,03 ^c	3,41 ± 0,07 ^b	3,81 ± 0,03 ^a	3,13 ± 0,01 ^c
Polpa sem tratamento			53,46 ± 0,16 ^a	47,43 ± 0,01 ^b	43,72 ± 0,00 ^c	13,43 ± 0,04 ^c	15,11 ± 0,04 ^b	15,24 ± 0,03 ^a

Amostra	Tratamentos		b*			h°		
	X ₁	X ₂	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	1	20	40	1	20	40
1	5,0	0,5	42,45 ± 0,01 ^c	48,17 ± 0,02 ^b	50,65 ± 0,03 ^a	77,22 ± 0,04 ^c	88,76 ± 0,01 ^a	87,70 ± 0,02 ^b
2	10,0	0,5	42,68 ± 0,01 ^c	48,89 ± 0,05 ^a	46,10 ± 0,03 ^b	77,90 ± 0,08 ^c	85,34 ± 0,02 ^b	88,34 ± 0,04 ^a
3	5,0	1,0	47,65 ± 0,03 ^a	47,94 ± 0,06 ^a	48,39 ± 0,04 ^a	89,30 ± 0,10 ^a	86,56 ± 0,02 ^c	86,86 ± 0,10 ^b
4	10,0	1,0	48,28 ± 0,40 ^c	49,46 ± 0,06 ^a	48,77 ± 0,14 ^b	88,93 ± 0,02 ^b	88,95 ± 0,02 ^b	90,32 ± 0,06 ^b
5	7,5	0,75	46,02 ± 0,20 ^b	52,35 ± 0,01 ^a	52,22 ± 0,09 ^a	90,97 ± 0,08 ^a	87,17 ± 0,02 ^c	88,03 ± 0,03 ^b
6	7,5	0,75	47,75 ± 0,03 ^b	47,74 ± 0,02 ^b	47,27 ± 0,05 ^a	86,75 ± 0,05 ^b	85,92 ± 0,02 ^c	87,57 ± 0,03 ^a
7	7,5	0,75	46,83 ± 0,05 ^c	47,58 ± 0,05 ^b	48,25 ± 0,03 ^a	85,83 ± 0,08 ^b	85,42 ± 0,04 ^c	86,29 ± 0,02 ^a
Polpa sem tratamento			42,13 ± 0,23 ^b	42,29 ± 0,07 ^b	43,61 ± 0,07 ^a	72,32 ± 0,08 ^a	70,34 ± 0,07 ^c	70,73 ± 0,05 ^b

X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%). ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

A luminosidade (L^*) das polpas tratadas conforme os tratamentos 3 e 6 aumentou durante o armazenamento (Tabela 6), demonstrando perda de coloração. Nos tratamentos 2 e 5 houve alteração na luminosidade somente aos 40 dias de armazenamento. Os valores de a^* e b^* (Tabela 6) mostram que o maná-cubiu apresenta predominância da cor vermelha em relação a cor verde (valor positivo de a^*), e o parâmetro b^* indica a presença de cor amarela (valor positivo de b^*).

As polpas submetidas aos tratamentos 1, 2, 6 e 7 apresentaram redução do parâmetro a^* ao longo do armazenamento, demonstrando a perda da coloração vermelha, enquanto os demais tratamentos apresentaram oscilações ao longo da estocagem. Houve aumento do parâmetro b^* (aumento da coloração amarela) durante o período de armazenamento para a polpa submetida aos tratamentos 1, 5, 6 e 7. A polpa tratada conforme o tratamento 3 não apresentou alteração, enquanto as polpas dos tratamentos 2 e 4 apresentaram oscilações no parâmetro b^* durante este período.

O ângulo de cor da polpa, expresso como h° , explica que a cor varia numa faixa entre 0 a 360° . Valores na faixa de 55° a 90° *Hue* apresentam a coloração laranja e 91° a 126° apresentam coloração amarela (Furlaneto, 2015). Os valores variaram de $70,34$ a $90,97^\circ$ *Hue* (Tabela 7), demonstrando que a polpa apresentou cor de laranja a amarela, durante o armazenamento.

5.5. Compostos bioativos: compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides e atividade antioxidante

5.5.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os valores médios de CFT da polpa de maná-cubiu variaram de 3,72 a 4,56 mg EAG/g de polpa no primeiro dia de armazenamento a 1,54 a 2,08 mg EAG/g de polpa no final da estocagem (Tabela 7). A retenção dos CFT durante o armazenamento variou de 40,1 (tratamento 7) a 54,6% (tratamento 1). Apesar dos tratamentos 5, 6 e 7 terem sido realizados na mesma condição, os teores de CFT variaram entre si e ao longo do armazenamento, provavelmente por variação nos frutos usados para preparo da polpa.

Tabela 7. Teores de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de polpa) durante o armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Amostras	Tratamentos		Tempo (dias)		
	X ₁	X ₂	1	20	40
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)			
1	5,0	0,5	3,81 ± 0,16 ^a	3,51 ± 0,18 ^a	2,08 ± 0,00 ^b
2	10,0	0,5	3,39 ± 0,06 ^a	3,25 ± 0,09 ^a	1,61 ± 0,01 ^b
3	5,0	1,0	4,56 ± 0,10 ^a	4,50 ± 0,11 ^a	2,08 ± 0,03 ^b
4	10,0	1,0	3,97 ± 0,13 ^a	3,13 ± 0,01 ^b	1,64 ± 0,06 ^c
5	7,5	0,75	4,30 ± 0,01 ^a	4,04 ± 0,19 ^a	2,00 ± 0,00 ^b
6	7,5	0,75	3,72 ± 0,02 ^a	3,21 ± 0,07 ^b	1,54 ± 0,01 ^c
7	7,5	0,75	4,09 ± 0,01 ^a	3,96 ± 0,03 ^b	1,64 ± 0,06 ^c
Polpa sem tratamento			3,72 ± 0,02 ^a	3,21 ± 0,07 ^b	1,54 ± 0,01 ^a

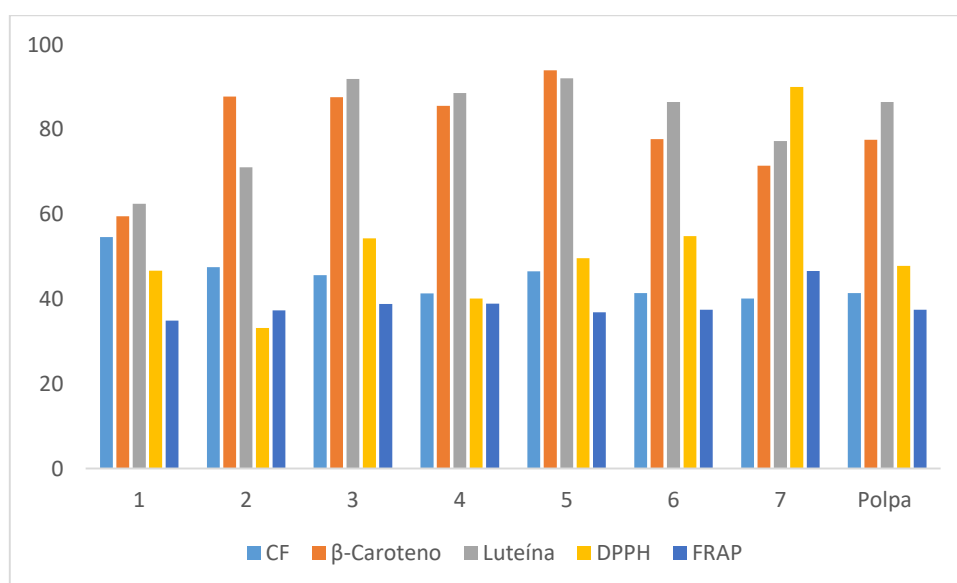
X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%). ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

A retenção dos compostos fenólicos presente na polpa de maná-cubiu estocada foi calculada comparando o valor inicial e ao final de 40 dias de armazenamento (Figura 6). A retenção de compostos fenólicos variou de 40,10% (tratamento 7) a 54,59% (tratamento 1). O tratamento 3 (70 °C/5 min e 1,0 % de ácido cítrico) resultou em maior estabilidade dos CFT até 20 dias de armazenamento, com 98,7% de retenção desses compostos.

Os dados de quantificação de CFT e atividade antioxidante em maná-cubiu são escassos na literatura. Além disso, há uma diversidade de métodos para a determinação de CF, os quais utilizam diferentes padrões analíticos e formas de expressar os resultados, o que dificulta a comparação entre os resultados. Sereno (2017) detectou de $0,74 \pm 0,03$ mg EAG/g de CFT em maná-cubiu cultivado no litoral do Paraná menor do que os encontrados neste trabalho. Rodrigues *et al.* (2013) encontraram 0,15 mg EAG/g de CFT em polpa de maná-cubiu liofilizada.

A diferença do teor de CFT pode ser atribuída a vários fatores, como a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, concentração de nutrientes, poluição atmosférica, danos mecânicos e ataque de patógenos. As condições agrônômicas também podem afetar a concentração dos CFT presentes no fruto (GOBBO-NETO; LOPES 2007; LLORACH *et al.*, 2008).

Figura 6. Retenção dos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) durante o armazenamento.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.5.2 Carotenoides

Os teores de β -caroteno nas polpas de maná-cubiu variaram de 3,32 a 5,58 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 8). As amostras dos tratamentos 3 (70 °C/7,5 min e 1,0 % de ácido cítrico), 4 (70 °C/10 min e 1,0 % de ácido cítrico) e 6 (70 °C/5 min e 0,75 % de ácido cítrico) apresentaram redução significativa de β -caroteno durante os primeiros 20 dias de armazenamento, depois permaneceram estáveis até o final da estocagem. Não houve uma relação direta entre redução dos carotenoides e redução do parâmetro de cor b^* .

Por outro lado, os teores de β -caroteno nas polpas submetidas aos tratamentos 2 (70 °C/10 min e 0,5 % de ácido cítrico) e 7 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico) permaneceram estáveis até 20 dias de armazenamento, seguidos por redução até o final da estocagem. Apesar dos tratamentos 5, 6 e 7 terem sido realizados na mesma condição, os teores de β -caroteno variaram entre si e ao longo do armazenamento.

Sereno (2017) encontrou $17,08 \pm 2,10$ μg de β -caroteno/g em maná-cubiu *in natura*, muito superior ao valor observado nas polpas analisadas neste trabalho. Entretanto, Rodrigues (2012) relatou 7,15 μg de β -caroteno/g de fruto maná-cubiu como carotenoide majoritário, porém obteve menor teor de luteína, 2,41 μg de luteína/g (em base seca), se comparado a este trabalho.

A variação do teor de carotenoides ocorre em função de diferentes cultivares, dos estádios de maturação, das condições de clima ou localização geográfica, da parte de planta utilizada, técnica de produção agrícola, armazenamento e processamento (SILVA *et al.*, 2010). Por serem moléculas altamente insaturadas, os carotenoides são suscetíveis à isomerização e oxidação, que geralmente ocorre durante o processo de industrialização (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Os valores de luteína variaram de 3,54 a 6,14 $\mu\text{g/g}$ para a polpa, e de 5,30 a 6,13 $\mu\text{g/g}$ para a polpa sem tratamento (Tabela 8). Em todos os tratamentos a estabilidade da luteína foi superior a 90% até 20 dias de armazenamento.

Tabela 8. Teores dos carotenoides β -caroteno e luteína ($\mu\text{g/g}$) durante o armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Amostra	Tratamentos		β - caroteno ($\mu\text{g/g}$)			Luteína ($\mu\text{g/g}$)		
	X ₁	X ₂	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	1	20	40	1	20	40
1	5,0	0,5	5,58 $\pm$ 0,06 ^a	5,09 $\pm$ 0,22 ^b	3,32 $\pm$ 0,15 ^c	5,72 $\pm$ 0,20 ^a	5,32 $\pm$ 0,10 ^a	3,57 $\pm$ 0,12 ^b
2	10,0	0,5	4,17 $\pm$ 0,24 ^a	4,38 $\pm$ 0,06 ^a	3,66 $\pm$ 0,13 ^b	4,98 $\pm$ 0,07 ^a	4,52 $\pm$ 0,23 ^a	3,54 $\pm$ 0,02 ^b
3	5,0	1,0	5,08 $\pm$ 0,04 ^a	4,79 $\pm$ 0,24 ^b	4,45 $\pm$ 0,31 ^b	5,53 $\pm$ 0,08 ^a	5,38 $\pm$ 0,06 ^b	5,08 $\pm$ 0,25 ^b
4	10,0	1,0	4,70 $\pm$ 0,26 ^a	4,39 $\pm$ 0,03 ^b	4,02 $\pm$ 0,27 ^b	4,91 $\pm$ 0,01 ^a	4,75 $\pm$ 0,25 ^a	4,35 $\pm$ 0,19 ^b
5	7,5	0,75	5,41 $\pm$ 0,15 ^b	5,58 $\pm$ 0,07 ^a	5,08 $\pm$ 0,21 ^c	6,14 $\pm$ 0,05 ^a	6,04 $\pm$ 0,18 ^a	5,65 $\pm$ 0,25 ^b
6	7,5	0,75	5,52 $\pm$ 0,13 ^a	4,99 $\pm$ 0,07 ^b	4,29 $\pm$ 0,29 ^b	6,13 $\pm$ 0,24 ^a	5,57 $\pm$ 0,07 ^b	5,30 $\pm$ 0,03 ^b
7	7,5	0,75	5,22 $\pm$ 0,04 ^a	5,19 $\pm$ 0,22 ^a	3,73 $\pm$ 0,18 ^b	5,44 $\pm$ 0,02 ^a	5,07 $\pm$ 0,23 ^a	4,20 $\pm$ 0,18 ^b
Polpa sem tratamento			5,53 $\pm$ 0,13 ^a	4,99 $\pm$ 0,07 ^b	4,29 $\pm$ 0,29 ^b	6,13 $\pm$ 0,24 ^a	5,57 $\pm$ 0,07 ^b	5,30 $\pm$ 0,03 ^b

X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%). ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

A retenção dos carotenoides presentes na polpa de maná-cubiu estocada foi calculada comparando o valor inicial e ao final de 40 dias de armazenamento (Figura 6). A retenção de β -caroteno variou de 59,50 a 93,90 %, enquanto a retenção da luteína variou de 62,41% a 92,02%, ambos para as amostras dos tratamentos 1 (70 °C/5 min e 0,5 % de ácido cítrico) e 5 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico), respectivamente. Este é um resultado muito positivo, pois apesar do tratamento com calor e ácido, a degradação dos carotenoides foi muito pequena quando o tratamento 5 foi utilizado. Entretanto, nas amostras do tratamento 1, a degradação dos compostos bioativos foi mais significativa, provavelmente porque a condição utilizada não foi suficiente para inativar as enzimas presentes no maná-cubiu, resultando em degradação ao longo do tempo.

5.5.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das polpas de maná-cubiu determinada pelos métodos de DPPH e FRAP apresentaram comportamentos semelhantes (Tabela 9). A atividade antioxidante das polpas variou de 3,31 a 10,59 $\mu\text{mol trolox/g}$ por DPPH (capacidade de sequestro de radicais livres) e de 8,79 a 29,80 $\mu\text{mol trolox/g}$ para FRAP (eficácia de redução do ferro) e reduziu em função do tempo de armazenamento, sendo esta redução mais acentuada nos primeiros 20 dias de armazenamento, semelhante à redução de CFT e carotenoides. No final da estocagem, as polpas submetidas aos tratamentos 1 e 3 apresentaram maiores valores de atividade antioxidante, 4,94 e 4,93 $\mu\text{mol trolox/g}$ para DPPH e 10,31 e 11,57 $\mu\text{mol trolox/g}$ para FRAP, respectivamente. A polpa de maná-cubiu submetida ao tratamento 3 (70 °C/5 min e 1,0 % de ácido cítrico) apresentou a maior atividade antioxidante determinada por FRAP, ao final de 40 dias de estocagem ($11,57 \pm 0,17 \mu\text{mol trolox/g}$, Tabela 9), enquanto, Sereno (2017) obteve $1,05 \pm 0,14 \mu\text{mol trolox/g}$ para atividade antioxidante para polpa de maná-cubiu liofilizado usando o método FRAP.

Resultados de atividade antioxidante de maná-cubiu estão relatadas na literatura. Sereno (2017) relatou atividade antioxidante de 3,60 $\mu\text{mol trolox/g}$ para a casca e 3,13 $\mu\text{mol trolox/g}$ na polpa de maná-cubiu liofilizado usando o método DPPH, semelhantes aos valores encontrados para as polpas neste trabalho, no final da estocagem. Por outro lado, Souza (2008) obteve $54 \pm 5 \mu\text{mol de trolox/g}$ amostra de atividade antioxidante (em base seca) pelo método DPPH.

Tabela 9. Atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$) durante o armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Amostra	Tratamentos		DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g}$)			FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$)		
	X ₁	X ₂	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	Tempo (min)	Ácido Cítrico (%)	1	20	40	1	20	40
1	5,0	0,5	10,59 $\pm$ 0,62 ^a	5,09 $\pm$ 0,33 ^b	4,94 $\pm$ 0,17 ^b	29,55 $\pm$ 0,86 ^a	12,41 $\pm$ 0,12 ^b	10,31 $\pm$ 0,10 ^c
2	10,0	0,5	9,98 $\pm$ 0,45 ^a	4,19 $\pm$ 0,18 ^b	3,31 $\pm$ 0,06 ^c	23,58 $\pm$ 0,34 ^a	10,45 $\pm$ 0,19 ^b	8,79 $\pm$ 0,01 ^c
3	5,0	1,0	9,08 $\pm$ 1,60 ^a	4,96 $\pm$ 1,04 ^b	4,93 $\pm$ 0,42 ^b	29,80 $\pm$ 0,67 ^a	12,61 $\pm$ 0,31 ^b	11,57 $\pm$ 0,17 ^b
4	10,0	1,0	10,20 $\pm$ 0,85 ^a	4,55 $\pm$ 0,01 ^b	4,09 $\pm$ 0,09 ^b	23,44 $\pm$ 1,21 ^a	11,40 $\pm$ 0,06 ^b	9,11 $\pm$ 0,02 ^c
5	7,5	0,75	9,76 $\pm$ 0,63 ^a	5,82 $\pm$ 0,24 ^b	4,84 $\pm$ 0,18 ^c	31,09 $\pm$ 0,13 ^a	13,54 $\pm$ 0,25 ^b	11,45 $\pm$ 0,29 ^c
6	7,5	0,75	8,35 $\pm$ 1,30 ^a	3,99 $\pm$ 0,06 ^b	4,58 $\pm$ 0,18 ^a	24,98 $\pm$ 0,95 ^a	11,48 $\pm$ 0,14 ^b	9,35 $\pm$ 0,61 ^c
7	7,5	0,75	5,39 $\pm$ 0,12 ^a	5,21 $\pm$ 0,24 ^b	4,85 $\pm$ 0,97 ^c	23,23 $\pm$ 0,06 ^a	12,74 $\pm$ 0,33 ^b	10,82 $\pm$ 0,28 ^c
Polpa sem tratamento			8,35 $\pm$ 1,31 ^a	4,58 $\pm$ 0,18 ^b	3,99 $\pm$ 0,06 ^b	24,98 $\pm$ 0,95 ^a	11,48 $\pm$ 0,14 ^b	9,35 $\pm$ 0,61 ^b

X₁ = tempo de tratamento a 70 °C (min.), X₂ = teor de ácido cítrico (%). ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

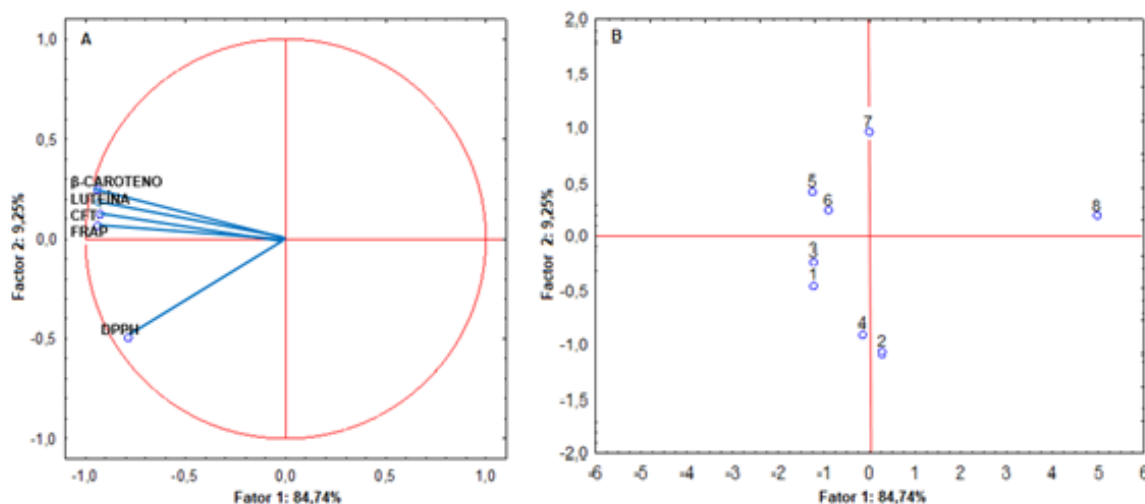
A retenção da atividade antioxidante da polpa de maná-cubiu estocada foi calculada comparando o valor inicial e ao final de 40 dias de armazenamento (Figura 6). A retenção da atividade oxidante medida por DDPH variou de 33,17 a 89,98 % para amostras dos tratamentos 2 e 7, respectivamente, enquanto a atividade oxidante medida por DDPH variou de 34,89 a 46,58% para amostras dos tratamentos 2 e 7, respectivamente.

5.5.4 Análise de componentes principais (ACP) utilizando compostos bioativos e atividade antioxidante

As polpas submetidas aos tratamentos foram caracterizadas em função dos compostos bioativos usando ACP. As Figuras 7, 8 e 9 apresentam a análise de componentes principais dos resultados de CFT, carotenoides (β – caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) durante 1, 20 e 40 dias de armazenamento, respectivamente. Para a Figura 7, a ACP mostrou que o primeiro e segundo componentes principais explicaram 84,74 % e 9,25 % da variação dos dados, respectivamente (93,99 % no total).

O primeiro componente principal foi explicado pelas análises de DPPH, CFT, FRAP, β -caroteno e luteína, com correlação positiva. Nenhum parâmetro foi correlacionado com o segundo componente principal. Estas análises caracterizam as amostras 1 (70 °C/5 min e 0,5% de ácido cítrico), 3 (70 °C/5 min e 1,0 % de ácido cítrico), 5 e 6 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico), uma vez que as amostras submetidas a estes tratamentos apresentaram elevados teores de CFT, β -caroteno e luteína e alta atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. A polpa sem tratamento foi caracterizada pela baixa atividade antioxidante pelo método DPPH, ou seja, esta amostra apresentou baixa atividade antioxidante pela degradação dos compostos, em função de não ter sido tratada.

Figura 7. Análise de componentes principais baseada nos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) no primeiro dia de armazenamento.

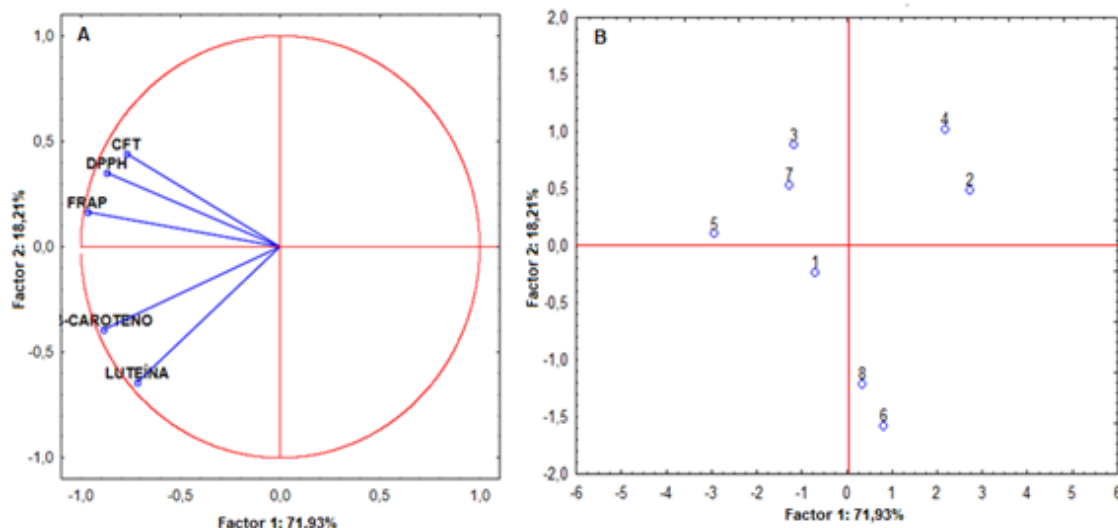


Fonte: Elaborado pelo autor. A – projeção das variáveis, B – projeção das amostras.

Aos 20 dias de armazenamento (Figura 8) o primeiro componente principal foi explicado pelas análises de CFT, atividade antioxidante por DPPH e FRAP, β -caroteno e luteína, com correlação positiva. Estas análises estão correlacionadas positivamente com a polpa submetida aos tratamentos 3 (70 °C/5 min e 1,0 % de ácido cítrico), 5 (70 °C/7,5 min e 0,75% de ácido cítrico) e 7 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico). Neste período, o componente principal 2 é explicado pelo teor luteína, que caracteriza a polpa submetida ao tratamento 1 (70 °C/5 min e 0,5 % de ácido cítrico). O primeiro e segundo componentes principais explicaram, respectivamente, 71,93 % e 18,21 % da variação dos dados (90,14% no total).

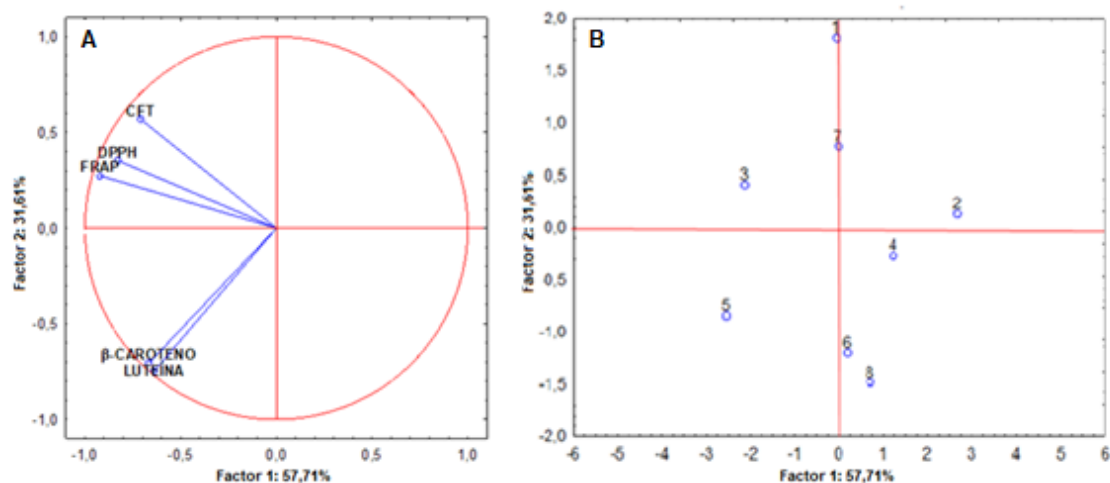
A Figura 9 apresenta a ACP dos resultados de CFT, β -caroteno e luteína e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) aos 40 dias de armazenamento. O tratamento 5 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico) é caracterizado pelos teores de β -caroteno e luteína, enquanto a polpa submetida ao tratamento 3 (70 °C/5 min e 1,0% de ácido cítrico) é caracterizada pelos teores de CFT e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH. O primeiro e segundo componentes principais explicaram, respectivamente, 57,71% e 31,61% da variação dos dados (89,32% no total).

Figura 8. Análise de componentes principais baseada nos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) aos 20 dias de armazenamento.



Fonte: Elaborado pelo autor. A – projeção das variáveis, B – projeção das amostras.

Figura 9. Análise de componentes principais baseada nos compostos fenólicos totais (CFT), carotenoides (β -caroteno e luteína) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) aos 40 dias de armazenamento.



Fonte: Elaborado pelo autor. A – projeção das variáveis, B – projeção das amostras.

Considerando os resultados dos compostos bioativos (CFT e carotenoides) ao longo do tempo, até 40 dias de armazenamento, a retenção desses compostos foi elevada, como mencionado anteriormente. Desta forma, a polpa preparada conforme as condições experimentais tem um potencial de apresentar até 40 dias de vida útil, sem degradação significativa dos compostos bioativos. Ainda, a polpa de maná-cubiu

tratada conforme o tratamento 5 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico) foi a escolhida para aplicação no leite fermentado, uma vez que apresentou elevada retenção de compostos bioativos, embora a retenção de compostos fenólicos não tenha sido o mais elevado. Para a elaboração do leite fermentado, um novo lote de frutas foi adquirido e a polpa foi extraída conforme o item 4.2.

5.6 Aplicação da polpa de maná-cubiu em leite fermentado: Caracterização físico-química e análises de biocompostos

5.6.1 Caracterização físico-química do fruto inteiro e da polpa de maná-cubiu

A Tabela 10 apresenta a composição centesimal do fruto inteiro (com casca e sementes) de maná-cubiu. Estas análises foram realizadas durante o primeiro dia de armazenamento e os resultados foram expressos em base úmida.

Tabela 10. Caracterização química do fruto de maná-cubiu para aplicação em leite fermentado. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Análises	Fruto
Umidade (%)	88,83 ± 0,24
Lipídeos (%)	0,40 ± 0,03
Proteínas (%)	0,69 ± 0,03
Cinzas (%)	0,72 ± 0,03
Carboidratos (%)	9,79 ± 0,29
Sólidos solúveis (%)	6,37 ± 0,15
pH	3,50 ± 0,10
Acidez total (%)	1,44 ± 0,06
Valor Energético kcal. 100g ⁻¹	45,52 ± 0,59

Carboidratos obtidos por diferença. Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

A caracterização química do maná-cubiu mostra similaridade com os relatados na literatura (Furlaneto, 2015). Algumas variações estão relacionadas ao teor de umidade, acidez e lipídeos (SOUZA, 2015; FUJITA, 2011, YUYAMA, 2007). Estas variações podem ser explicadas por vários fatores, como diferentes condições de

clima e solo utilizadas no cultivo dos frutos, variedade de espécies analisadas, época do ano e diferentes estágios de maturação.

A polpa de maná-cubiu apresentou valores constantes de pH, umidade, lipídeos, proteína e valor energético durante todo o período 40 dias de armazenamento (Tabela 11). A acidez e os valores de sólidos solúveis são características importantes, pois influenciam o sabor e aroma dos frutos (MOREIRA, 2014). Houve ligeiro aumento da acidez (de 2,74 % a 3,01%) e dos teores de sólidos solúveis (de 7,17 % a 7,83%) durante os primeiros 20 dias de armazenamento, seguido por estabilidade até os 40 dias de armazenamento. Os teores de cinzas e carboidratos também aumentaram durante o período de armazenamento, 0,73 % a 0,79% para cinzas e 5,34 % a 5,59 % para carboidratos por diferença.

Tabela 11. Análises físico-químicas da polpa de maná-cubiu processada conforme o tratamento 5 (70 °C/7,5 min e 0,75 % de ácido cítrico), durante 40 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Análise	Tempo (dias)		
	1	20	40
Umidade (%)	90,89 ± 0,04 ^a	90,78 ± 0,10 ^a	90,58 ± 0,24 ^a
Lipídeos (%)	0,71 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,03 ^a
Proteína (%)	0,50 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,01 ^a
Cinzas (%)	0,95 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,02 ^a
Carboidrato (%)	7,16 ± 0,02 ^b	7,06 ± 0,06 ^c	7,28 ± 0,20 ^a
Sólidos solúveis (%)	7,17 ± 0,15 ^b	7,85 ± 0,07 ^a	7,83 ± 0,06 ^a
pH	3,3 ± 0,17 ^a	3,1 ± 0,00 ^a	3,2 ± 0,00 ^a
Acidez (%)	2,74 ± 0,10 ^b	3,01 ± 0,00 ^a	3,01 ± 0,03 ^a
Fibra alimente total (%)	1,5	-	-
Fibra alimentar insolúvel (%)	0,2	-	-
Fibra alimentar solúvel (%)	1,3	-	-
Valor Energético kcal/100 g	37,00 ± 0,03 ^b	36,69 ± 0,40 ^b	37,43 ± 1,07 ^a

Carboidratos obtidos por diferença. ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste 1de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Foram detectados 12 tipos de ácidos graxos na polpa de maná-cubiu (Tabela 12), sendo 0,287 g ácidos graxos saturados, 0,385 g ácidos graxos monoinsaturados e 0,026 g ácidos graxos poli-insaturados em 100 g de polpa.

Os ácidos graxos poli-insaturados pertencem a diferentes séries, sendo denominados ômega-3, ômega-6 e ômega-9 (JORGE, 2009). Os ácidos poli-insaturados possuem propriedades funcionais, incluindo anticancerígena, antiaterogênica, antiobesidade e moduladora do sistema imunológico (KOBA; YANAGITA, 2014; RENES *et al.*, 2017).

Tabela 12. Perfil de ácidos graxos presente na polpa de maná-cubiu.

Ácido graxo	Notação	Ácido graxo (g/100 g polpa)
Láurico	C12:0	0,004
Mirístico	C14:0	0,022
Miristoleico	C14:1	0,004
Palmítico	C16:0	0,221
Palmitoleico	C16:1	0,018
Esteárico	C18:0	0,027
Oleico	C18:1c (ω -9)	0,359
Linoleico	C18:2-c (ω -6)	0,015
Linolênico	C18:3 (ω -3)	0,010
Araquídico	C20:0	0,007
Gadoleico	C20:1	0,005
Lignocérico	C24:0	0,004
Saturados		0,287
Monoinsaturados		0,385
Poli-insaturados		0,026

O ácido palmítico e o ácido oleico são os dois ácidos graxos predominantes na polpa de maná-cubiu, representando 31,6% e 51,2%, respectivamente. Os ácidos palmítico e oleico também foram detectados em polpa liofilizada de maracujá (0,37 g/100 g e 0,27 g/100 g polpa, respectivamente) e em polpa seca de buriti (8,19 g/100 g e 34,35 g/100 g polpa, respectivamente) (BORGONOV, 2018). O ácido palmítico é

um ácido saturado amplamente distribuído na natureza; ocorre praticamente em todos os óleos e gorduras de plantas, animais terrestres e aquáticos (JORGE, 2009). O ácido oleico (ω -9) é um ácido monoinsaturado mais comum entre todos os ácidos graxos; possui ação na redução do risco de doenças induzidas por espécies reativas de oxigênio e melhora o sistema imunológico (RYDLEWSKI *et al.*, 2017). Também atua na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, artrite inflamatória e artrite reumatoide (SARAVANAN; DAVIDSON, 2010; ASIF, 2011).

Na polpa de maná-cubiu foi detectado cerca de 0,359 g de ácido oleico por 100 g de polpa. Esse ácido graxo auxilia a adesão de cepas probióticas na mucosa da porção distal do intestino (DAS; FAMS, 2002).

A polpa de maná-cubiu apresentou 0,010 g ácido linolênico (ω -3) por 100 g de polpa, considerado ácido graxo essencial à alimentação humana. Este ácido graxo possui efeito hipocolesterolêmico, reduz o risco de várias doenças (cardiovasculares, inflamações) e pode ser consumido na forma *in natura*, o que é uma vantagem nutricional, posto que este ácido graxo é altamente insaturado e suscetível à oxidação pelo aquecimento.

Os ácidos linoleico e linolênico são comuns em óleos vegetais e peixes, respectivamente, não são produzidos pelos mamíferos, e por isso, devem estar presentes na dieta (GREEN *et al.*, 2007; KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017).

5.6.2 Compostos bioativos presentes no fruto e na polpa de maná-cubiu aplicada no leite fermentado

Houve redução dos compostos bioativos na polpa de maná-cubiu ao longo de 40 dias de armazenamento (Tabela 13). Os teores de compostos fenólicos variaram de 8,70 a 8,21 mg EAG/g de polpa. Os teores de antioxidantes variaram de 16,07 a 4,35 μ mol Trolox/g (DPPH) e 11,85 a 8,32 μ mol Trolox/g (FRAP). Estatisticamente, os teores de β -caroteno e luteína se mantiveram constantes ao longo do armazenamento.

Tabela 13. Teores de compostos bioativos e atividade antioxidante no fruto e na polpa de maná-cubiu. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Método	Fruto	Polpa de Maná-cubiu		
		1 dia	20 dias	40 dias
Fenólicos (mg EAG/g de polpa)	9,26 ± 0,57 ^a	8,70 ± 0,30 ^b	7,97 ± 0,26 ^d	8,21 ± 0,21 ^c
β-caroteno (μg/g)	3,18 ± 0,91 ^a	2,84 ± 0,36 ^a	2,85 ± 0,21 ^a	2,78 ± 0,59 ^a
Luteína (μg/g)	3,62 ± 1,30 ^a	3,00 ± 0,26 ^a	2,90 ± 0,22 ^a	2,87 ± 0,21 ^a
DPPH (μmol Trolox/g)	9,71 ± 0,49 ^b	16,07 ± 1,28 ^a	5,77 ± 0,50 ^c	4,35 ± 0,02 ^d
FRAP (μmol Trolox/g)	7,99 ± 0,61 ^d	11,85 ± 0,59 ^a	9,88 ± 1,03 ^b	8,32 ± 0,33 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

Os valores da atividade antioxidante do fruto *in natura* foram menores que da polpa de maná-cubiu, 9,71 μmol Trolox/g (DPPH) e 7,99 μmol Trolox/g (FRAP), enquanto a polpa apresentou valores de 16,07 μmol Trolox/g (DPPH) e 11,85 μmol Trolox/g (FRAP). Apesar da polpa ter sido tratada e estocada por 40 dias, provavelmente, esta diferença entre a atividade antioxidante da fruta *in natura* e da polpa tratada está relacionada às degradações que ocorrem na fruta após a trituração, decorrentes da ação enzimática e oxidação.

5.6.3 Efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade de BAL

A polpa de maná-cubiu foi testada na presença de 10 cepas probióticas, conforme item 4.7. Houve crescimento de diversas cepas ao longo do tempo, com exceção da cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 que teve redução na viabilidade após 8 h de fermentação. As cepas *L. plantarum* ST8Sh e *E. faecium* SJRP65 apresentaram a maior viabilidade no tratamento controle e na presença da polpa de maná-cubiu (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade de bactérias acidoláticas durante 24 h de incubação (log UFC/mL).

Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tempo (h)	<i>Lactobacillus</i> spp.					<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. faecium</i>		<i>E. durans</i>	<i>S. thermophilus</i>
	ST8Sh	SJRP30	SJRP38	SJRP43	SJRP57	GG	SJRP20	SJRP65	SJRP29	ST 080
Controle										
0	6,68±0,05 ^{Fd}	6,74±0,03 ^{Ic}	6,48±0,01 ^{Ie}	5,60±0,03 ^{Gf}	4,74±0,01 ^{Gg}	6,91±0,04 ^{Jb}	6,31±0,23 ^{De}	6,46±0,02 ^{He}	6,87±0,03 ^{Ib}	8,94±0,01 ^{Fa}
4	7,62±0,09 ^{Eg}	6,90±0,08 ^{Gi}	7,46±0,15 ^{Hh}	7,90±0,06 ^{Fd}	5,64±0,01 ^{Fj}	7,72±0,11 ^{Ff}	8,64±0,04 ^{Cb}	9,71±0,05 ^{Ba}	8,44±0,07 ^{Ec}	7,89±0,04 ^{Ge}
8	9,41±0,10 ^{Cc}	8,80±0,11 ^{Be}	8,96±0,04 ^{Cd}	9,47±0,08 ^{Ac}	6,81±0,06 ^{Dh}	7,74±0,03 ^{Fg}	9,77±0,01 ^{Ab}	10,49±0,06 ^{Aa}	8,62±0,09 ^{Df}	8,71±0,31 ^{Fe}
12	9,57±0,07 ^{Ca}	9,06±0,01 ^{Ab}	9,52±0,05 ^{Ba}	9,50±0,07 ^{Aa}	4,74±0,03 ^{Gf}	8,82±0,02 ^{Bd}	9,44±0,08 ^{Ba}	8,94±0,04 ^{Fc}	9,44±0,13 ^{Aa}	8,66±0,11 ^{Fe}
24	11,70±0,20 ^{Aa}	7,58±0,28 ^{Fe}	9,85±0,12 ^{Ac}	9,61±0,20 ^{Ac}	3,69±0,12 ^{Hf}	8,95±0,16 ^{Ad}	9,66±0,12 ^{Ac}	10,64±0,01 ^{Ab}	9,08±0,05 ^{Bd}	8,89±0,25 ^{Fd}
1% de Polpa										
0	6,68±0,01 ^{Fc}	6,48±0,04 ^{Jc}	6,44±0,07 ^{Ic}	5,67±0,23 ^{Ge}	4,75±0,10 ^{Gg}	7,46±0,09 ^{Ib}	5,59±0,01 ^{Ff}	5,90±0,05 ^{Id}	7,57±0,11 ^{Hb}	9,43±0,16 ^{Da}
4	7,71±0,12 ^{Ed}	6,61±0,03 ^{If}	7,52±0,01 ^{He}	7,73±0,06 ^{Fd}	5,93±0,07 ^{Eg}	7,45±0,01 ^{Ie}	8,62±0,01 ^{Cb}	8,87±0,03 ^{Fa}	8,06±0,02 ^{Fc}	8,94±0,03 ^{Fa}
8	8,55±0,08 ^{Dd}	7,98±0,05 ^{Ef}	9,37±0,17 ^{Bb}	8,49±0,11 ^{Ee}	8,52±0,12 ^{Ae}	7,59±0,02 ^{Gg}	8,76±0,01 ^{Cc}	9,47±0,12 ^{Eb}	8,54±0,34 ^{Dd}	9,91±0,05 ^{Ba}
12	8,48±0,05 ^{Dc}	8,43±0,16 ^{Dc}	8,45±0,13 ^{Fc}	7,92±0,02 ^{Fd}	7,62±0,07 ^{Ce}	7,56±0,09 ^{He}	8,74±0,02 ^{Cb}	8,47±0,15 ^{Gc}	8,80±0,03 ^{Cb}	9,95±0,02 ^{Ba}
24	9,87±0,25 ^{Bb}	8,99±0,03 ^{Bd}	8,64±0,02 ^{Ee}	8,56±0,09 ^{De}	7,98±0,06 ^{Bf}	8,64±0,01 ^{Ce}	9,86±0,07 ^{Ab}	9,50±0,02 ^{Dc}	9,33±0,21 ^{Ac}	10,56±0,10 ^{Aa}
3% de Polpa										
0	6,69±0,06 ^{Fd}	6,46±0,09 ^{Ke}	6,50±0,04 ^{Ie}	5,78±0,11 ^{Gf}	4,77±0,01 ^{Gg}	6,77±0,01 ^{Jc}	5,84±0,01 ^{Ef}	6,50±0,01 ^{He}	6,97±0,05 ^{Ib}	9,27±0,32 ^{Ea}
4	7,57±0,11 ^{Ed}	6,78±0,16 ^{He}	7,48±0,02 ^{Hd}	7,83±0,03 ^{Fb}	5,72±0,01 ^{Ff}	7,66±0,19 ^{Gc}	8,73±0,02 ^{Ca}	8,87±0,09 ^{Fa}	7,80±0,09 ^{Gb}	8,79±0,01 ^{Fa}
8	8,67±0,10 ^{Db}	8,83±0,31 ^{Bb}	8,78±0,12 ^{Db}	8,73±0,06 ^{Cb}	7,93±0,01 ^{Bc}	7,87±0,02 ^{Dc}	9,44±0,08 ^{Ba}	9,65±0,15 ^{Ca}	9,37±0,41 ^{Aa}	9,68±0,06 ^{Ca}
12	8,64±0,06 ^{Dc}	8,74±0,19 ^{Cc}	8,41±0,12 ^{Ge}	8,67±0,07 ^{Cc}	7,55±0,05 ^{Cg}	7,78±0,15 ^{Ef}	8,76±0,06 ^{Cc}	8,78±0,05 ^{Fb}	8,56±0,08 ^{Dd}	9,70±0,04 ^{Ca}
24	9,28±0,34 ^{Cc}	8,76±0,16 ^{Be}	8,53±0,05 ^{Fe}	8,90±0,14 ^{Bd}	7,96±0,05 ^{Bf}	8,89±0,17 ^{Ad}	9,67±0,25 ^{Ab}	9,81±0,14 ^{Ba}	8,66±0,36 ^{De}	9,85±0,09 ^{Ba}

ST8 – *L. plantarum* ST8Sh; SJRP30 – *L. fermentum*; SJRP38 – *L. casei*; SJRP43 – *L. fermentum*; SJRP57 – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; GG – *L.*

rhamnosus GG ATCC 53103; SJRP20 – *E. faecium*; SJRP65 – *E. faecium*; SJRP29 – *E. durans*; ST 080 - *S. thermophilus* ST 080. Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) no mesmo tempo de incubação. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) para mesma cepa e diferentes concentrações de polpas de maná-cubiu no mesmo tempo de incubação.

A população inicial de *S. thermophilus* ST 080 foi superior às demais cepas testadas na presença de maná-cubiu, e se manteve próxima a 8 log UFC/mL em todos os tratamentos. O efeito da polpa de maná-cubiu na viabilidade foi dependente da cepa. *L. plantarum* ST8Sh, *L. casei* SJRP38, *L. fermentum* SJRP43 e *E. faecium* SJRP65 apresentaram maior viabilidade após 24 h de fermentação, na ausência de polpa de maná-cubiu. Nas demais cepas, a adição de polpa não afetou a viabilidade das BAL ou apresentou maior viabilidade. A polpa de fruta contém compostos, tal como as fibras, que podem ser usados como substratos pelas BAL e aumentarem sua viabilidade.

O crescimento das bactérias probióticas no leite é lento devido à falta de enzimas proteolíticas, por isso, são utilizadas culturas iniciadoras para acelerar a produção de iogurtes e leites fermentados (MARAFON *et al.*, 2011). A adição de compostos (fibras, polpa de frutas, farinhas de vegetais, etc) que aumente os sólidos no leite também favorece a viabilidade das bactérias probióticas (SODINI *et al.*, 2005).

Durante a fermentação, as bactérias acidoláticas convertem a lactose em ácido láctico, reduzindo o pH do leite até atingir 4,6 (ponto isoelétrico da caseína), quando há formação do gel (LEE; LUCEY, 2010). Desta forma, o monitoramento do pH é um dos parâmetros mais importantes para avaliar o desenvolvimento da cultura analisada.

Apesar de *E. faecium* SJRP65 ter apresentado a maior viabilidade no tratamento controle e na presença da polpa de maná-cubiu e ter sido previamente caracterizada como potencialmente probiótica (NASCIMENTO *et al.*, 2019), alguns estudos, entretanto, demonstram que *Enterococcus* sp. podem agir como patógenos emergentes, pelo risco de transferência de genes de virulência, e de resistência antimicrobiana para outros micro-organismos presentes no trato gastrointestinal (OUWEHAND *et al.*, 2001). Por consequência, são recomendados estudos visando demonstrar não só as características probióticas do *E. faecium*, mas, principalmente, a sua inocuidade em relação à saúde do consumidor.

Diante deste cenário, para o desenvolvimento do leite fermentado foi escolhida a cepa probiótica de *L. plantarum* ST8Sh, em co-cultura com *S. thermophilus* ST 080, adicionado 3% de polpa de maná-cubiu. *L. plantarum* é uma bactéria versátil, encontrada em vários nichos ambientais, como em vegetais, produtos lácteos e carnes, também está presente no trato gastrointestinal humano (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003). Devido a esta versatilidade *L. plantarum* é um dos micro-organismos mais

importantes na indústria alimentícia, e tem sido usado na fermentação de frutas e vegetais (DI CAGNO *et al.*, 2010; CAGNO *et al.*, 2011; SABO *et al.*, 2014).

Além disso, *Lactobacillus plantarum* ST8Sh produz a bacteriocina da família da pediocina PA-1 e apresenta atividade frente a diversas LAB, tais como *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp., e frente a patógenos, tais como *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria* spp. (TODOROV; HOLZAPFEL; NERO, 2016). Esta característica é bastante importante, uma vez que pode auxiliar na conservação do produto durante a estocagem.

5.6.4 Curva de acidificação de leite fermentado com *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080

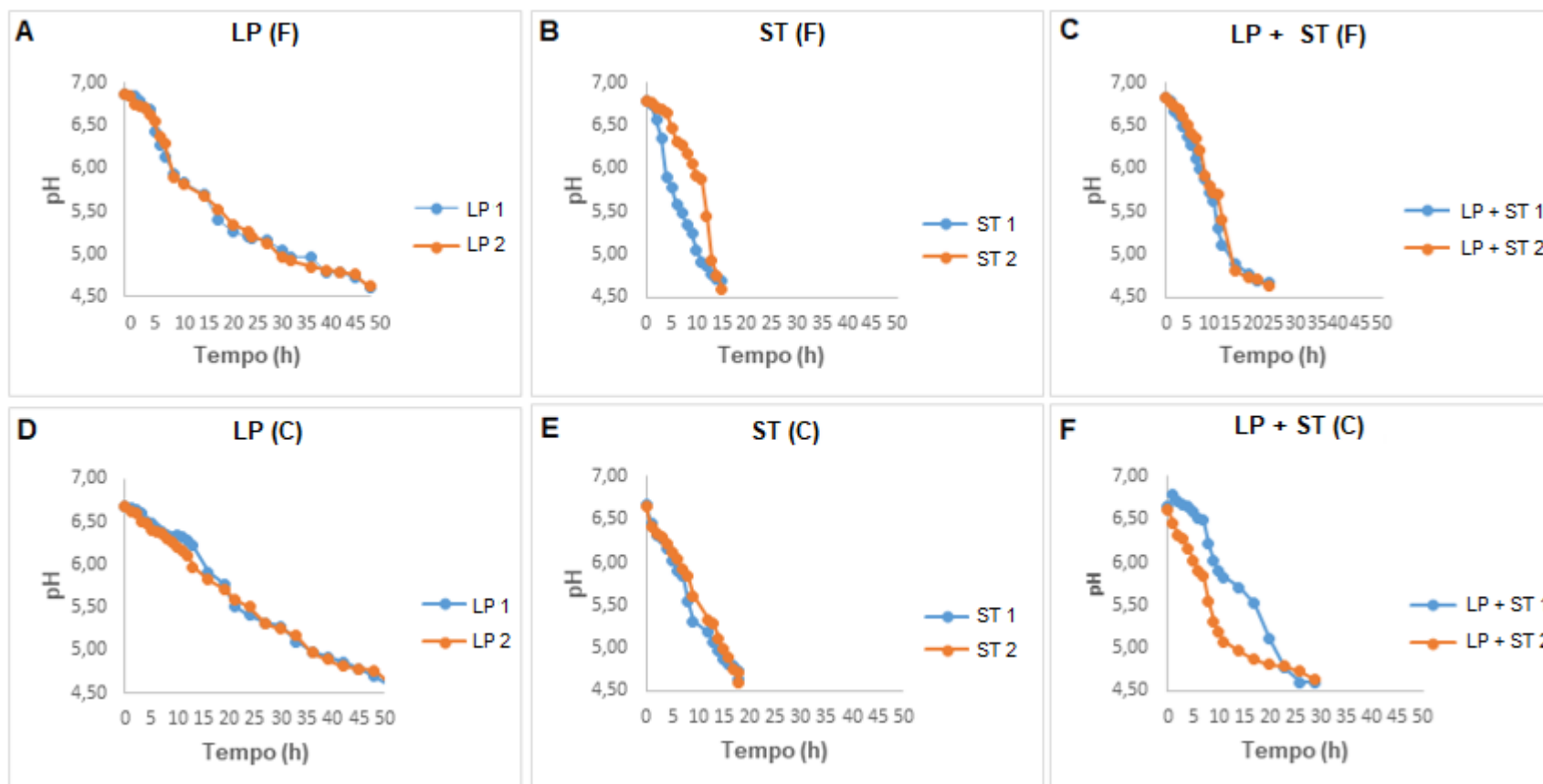
A avaliação da cinética de fermentação do leite controle e leite adicionado de 3% de polpa de maná-cubiu (Figura 10) mostra que o uso de polpa para elaboração do leite fermentado não influenciou o crescimento do *L. plantarum* ST8Sh, sendo que o tratamento controle (sem adição de polpa) apresentou o mesmo tempo de fermentação.

S. thermophilus ST 080 atuou acelerando a produção de ácidos e reduz o pH, que estimula o crescimento do *L. plantarum* ST8Sh. Do ponto de vista industrial, um tempo de fermentação prolongado seria inviável, pois aumenta o custo de processo e reduz a produtividade. Porém, a adição de culturas com elevada atividade metabólica, como é o caso do *S. thermophilus*, soluciona este problema (LEE; LUCEY, 2010).

S. thermophilus ST 080, na presença de 3 % polpa de maná-cubiu, apresentou maior tempo de fermentação (18 h) quando comparado ao controle (15 h). Elevado tempo de fermentação foi relatado por Busanello (2016), que determinou a viabilidade de *S. thermophilus* em amostras de leite fermentado com farinha de banana verde e obteve 18 h de fermentação para atingir pH 5.

A combinação de *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080 foi a que apresentou o melhor desempenho (menor tempo de fermentação) quando comparada aos outros tratamentos testados; o tempo de fermentação reduziu de 50 h (cultura pura de *L. plantarum* ST8Sh) para 25 h (*L. plantarum* ST8Sh em co-cultura com *S. thermophilus* ST 080).

Figura 10. Curva de acidificação do leite fermentado com *L. plantarum* ST8Sh (LP) e *S. thermophilus* ST 080 (ST) e *L. plantarum* em co-cultura com *S. thermophilus* (LP + ST), adicionado de polpa de maná-cubiu (F) e controle (C).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.7 Caracterização físico-química, determinação de biocompostos e análise microbiológica do leite fermentado

5.7.1 Composição centesimal, pH, acidez, CRA e sinérese do leite fermentado

Os teores de umidade, proteína e de carboidratos do leite fermentado em todos os tratamentos não diferiram entre si (Tabela 15). Os teores de cinzas do leite fermentado controle foram superiores aos do leite fermentado com polpa de maná-cubiu, 1,70 a 1,83 % e 1,42 a 1,45 %, respectivamente.

Os teores de lipídeos variaram de 0,13 a 0,16%, e o valor calórico dos leites fermentados foram diferentes em todos os tratamentos; no entanto, com pequenas variações, de 44,25 a 48,78 kcal/100 g.

Houve aumento do valor de pH no leite fermentado contendo polpa de maná-cubiu ao longo do armazenamento (Tabela 16); este resultado não era esperado e pode estar relacionado com degradação dos constituintes da polpa de maná-cubiu (Tabelas 7 e 8). As amostras dos tratamentos controle (LP, ST e LP + ST) apresentaram redução do pH ao longo do armazenamento, devido à produção de ácido láctico pelas bactérias acidoláticas.

A acidez titulável dos leites fermentados aumentou ao longo dos 28 dias de estocagem em todos os tratamentos (Tabela 17). Os teores variaram de 0,90 a 1,83 g de ácido láctico/100 g, e atendem ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leites Fermentados (0,6 a 2,0 g de ácido láctico/100 g) (BRASIL, 2007). Este aumento da acidez no leite fermentado está relacionado com a presença de bactérias acidoláticas que hidrolisam a lactose presente no meio em glicose e galactose, produzindo ácido láctico a partir da fermentação de glicose (PENNA *et al.*, 2015). Campos *et al.* (2017) também observaram aumento na acidez em leite fermentado com adição de polpa de açaí ao longo do período de armazenamento, principalmente entre 14 e 28 dias de estocagem.

Tabela 15. Composição centesimal de leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle). Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)	Valor Energético kcal.100 g ⁻¹
Adicionado de polpa						
LP	87,65 ± 0,06 ^A	1,45 ± 0,01 ^C	4,11 ± 0,00 ^A	0,13 ± 0,01 ^B	6,66 ± 0,06 ^A	44,25 ± 0,20 ^F
ST	86,87 ± 0,45 ^A	1,44 ± 0,00 ^C	4,38 ± 0,08 ^A	0,13 ± 0,01 ^B	7,18 ± 0,55 ^A	47,43 ± 1,78 ^B
LP + ST	87,49 ± 0,23 ^A	1,42 ± 0,01 ^C	4,25 ± 0,18 ^A	0,13 ± 0,01 ^B	6,71 ± 0,48 ^A	44,99 ± 0,93 ^D
Controle						
LP	86,95 ± 0,44 ^A	1,70 ± 0,02 ^B	4,21 ± 0,01 ^A	0,14 ± 0,00 ^B	7,00 ± 0,69 ^A	46,13 ± 1,73 ^C
ST	86,18 ± 0,23 ^A	1,82 ± 0,01 ^A	4,24 ± 0,03 ^A	0,16 ± 0,00 ^A	7,60 ± 0,18 ^A	48,78 ± 0,88 ^A
LP + ST	87,22 ± 0,14 ^A	1,83 ± 0,02 ^A	4,35 ± 0,03 ^A	0,16 ± 0,00 ^A	6,44 ± 0,20 ^A	44,60 ± 0,59 ^E

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Tabela 16. Valores de pH em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	Tempo (dias)		
	1	14	28
Adicionado de polpa			
LP	4,61 ± 0,01 ^{Ab}	4,61 ± 0,10 ^{Bb}	4,81 ± 0,01 ^{Ba}
ST	4,64 ± 0,06 ^{Ab}	4,93 ± 0,02 ^{Aa}	4,94 ± 0,02 ^{Aa}
LP + ST	4,66 ± 0,04 ^{Ab}	4,95 ± 0,06 ^{Aa}	4,92 ± 0,02 ^{Aa}
Controle			
LP	4,61 ± 0,01 ^{Aa}	4,56 ± 0,03 ^{Cb}	4,53 ± 0,03 ^{Cc}
ST	4,62 ± 0,02 ^{Aa}	4,56 ± 0,02 ^{Cb}	4,41 ± 0,01 ^{Dc}
LP + ST	4,61 ± 0,02 ^{Aa}	4,58 ± 0,00 ^{Cb}	4,46 ± 0,02 ^{Dc}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST 080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Tabela 17. Acidez titulável em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	Tempo (dias)		
	1	14	28
Adicionado de polpa			
LP	1,32 ± 0,02 ^{Bb}	1,39 ± 0,01 ^{Bb}	1,63 ± 0,01 ^{Aa}
ST	0,95 ± 0,02 ^{Cb}	0,90 ± 0,04 ^{Cb}	1,29 ± 0,12 ^{Ba}
LP + ST	1,21 ± 0,04 ^{Bb}	1,24 ± 0,04 ^{Bb}	1,33 ± 0,01 ^{Ba}
Controle			
LP	1,46 ± 0,04 ^{Ab}	1,76 ± 0,06 ^{Aa}	1,83 ± 0,04 ^{Aa}
ST	0,94 ± 0,02 ^{Cc}	1,42 ± 0,06 ^{Bb}	1,67 ± 0,02 ^{Aa}
LP + ST	0,99 ± 0,04 ^{Cc}	1,13 ± 0,14 ^{Cb}	1,30 ± 0,00 ^{Ba}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST 080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Ao longo dos 28 dias de armazenamento, houve pós-acidificação nos leites fermentados em todos os tratamentos e a CRA diminuiu ou se manteve constante. (Tabela 18). A CRA dos leites fermentados por *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080 adicionados de polpa de maná-cubiu e leites fermentados por *L. plantarum* ST8Sh em co-cultura com *S. thermophilus* ST 080 sem adição de polpa se manteve constante ao longo do armazenamento. Este resultado pode estar relacionado à presença de pectina na polpa de maná-cubiu (SILVA FILHO, 2003) e/ou à produção de exopolissacarídeos por *S. thermophilus* ST 080. Nos demais tratamentos, a CRA diminuiu durante os primeiros 14 dias e se manteve estável durante o restante do armazenamento. Portanto, as diferenças observadas na CRA dos leites fermentados possivelmente são devidas às diferenças na estrutura do gel formado durante a fermentação.

Tabela 18. Capacidade de retenção de água (CRA) em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento

Tratamentos	Tempo (dias)		
	1	14	28
Adicionado de polpa			
LP	41,20 ± 0,01 ^{Ca}	36,85 ± 0,60 ^{Ab}	37,46 ± 0,39 ^{Ab}
ST	40,70 ± 0,22 ^{Ea}	38,90 ± 1,94 ^{Aa}	38,20 ± 0,73 ^{Aa}
LP + ST	41,99 ± 1,14 ^{Ca}	40,25 ± 0,10 ^{Aa}	39,74 ± 0,21 ^{Aa}
Controle			
LP	44,81 ± 0,77 ^{Ba}	37,40 ± 0,97 ^{Ab}	36,90 ± 2,38 ^{Ab}
ST	39,04 ± 1,44 ^{Da}	41,47 ± 1,24 ^{Aa}	37,92 ± 1,38 ^{Aa}
LP + ST	45,64 ± 0,25 ^{Aa}	38,84 ± 0,71 ^{Ab}	38,25 ± 0,32 ^{Ab}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST 080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

A interação das proteínas com a água ocorre através da formação de ligações, como as pontes de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo ou interações com os grupos ionizados das cadeias laterais dos aminoácidos. Assim, quanto maior for a proporção de aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas, maior será a CRA dos sistemas compostos pela proteína (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Com o aumento da acidez do

iogurte durante o período de estocagem, principalmente nos primeiros dias quando a pós acidificação é mais acentuada, pode ocorrer uma contração do coágulo do iogurte, que pode desestabilizar a estrutura formada e resultar em redução da CRA (ACHANTA; ARYANA; BOENEKE, 2007). De uma maneira geral, os principais fatores que afetam a CRA são: composição de aminoácidos, sua estrutura e conformação, a polaridade e a carga na superfície, a força iônica, o pH e a temperatura (DAMODARAN; PERKIN; FENNEMA, 2010).

Moretti (2009) analisou o efeito da suplementação do leite com diferentes tipos de proteínas (soro de leite, soja e colágeno), fermentado com culturas lácticas tradicionais e probióticas. O aumento da concentração de suplemento protéico resultou em aumento da CRA e redução da sinérese dos iogurtes. Possivelmente, as mudanças de CRA ao longo do tempo de armazenagem do iogurte são devido à modificação da estrutura do gel formado durante este período de estocagem.

Houve redução da sinérese espontânea no leite fermentado quando *S. thermophilus* ST 080 foi usado na forma de cultura pura, com adição de polpa de maná-cubiu e quando *S. thermophilus* ST 080 e *L. plantarum* ST8Sh foram usados na forma de cultura pura, no produto controle (Tabela 19). A propensão a sinérese durante a estocagem é umas das características estruturais mais importantes em leite fermentado (AKALIN *et al.*, 2012).

O fenômeno de sinérese é indesejável e ocorre devido a um rearranjo da rede formada pelos coágulos, levando a um aumento no número de junções partícula-partícula, fazendo com que o coágulo se retraia, expelindo um líquido intersticial (ANTUNES, 2004).

A redução da sinérese ao longo do tempo de armazenamento pode estar relacionada à uma maior absorção de água pela matriz do coágulo do iogurte, que podem ser causadas por mudanças na sua estrutura e formação de mais ligações entre as proteínas e o soro livre (MORETTI, 2009).

Tabela 19. Sinérese em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	Tempo (dias)		
	1	14	28
Adicionado de polpa			
LP	42,17 ± 1,65 ^{Aa}	40,83 ± 1,18 ^{Ba}	44,50 ± 1,65 ^{Aa}
ST	48,83 ± 0,71 ^{Aa}	23,50 ± 2,59 ^{Db}	22,17 ± 3,06 ^{Bb}
LP + ST	40,50 ± 1,18 ^{Aa}	39,33 ± 0,94 ^{Ca}	40,00 ± 0,94 ^{Aa}
Controle			
LP	40,00 ± 0,94 ^{Aa}	25,00 ± 2,36 ^{Db}	12,50 ± 1,18 ^{Bc}
ST	48,33 ± 1,41 ^{Aa}	42,50 ± 2,89 ^{Ba}	20,83 ± 1,18 ^{Bb}
LP + ST	51,17 ± 1,65 ^{Aa}	51,17 ± 3,06 ^{Aa}	49,17 ± 3,54 ^{Aa}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST 080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

5.7.2 Biocompostos em leite fermentado

Durante o decorrer da estocagem houve um aumento significativo de compostos fenólicos totais nos leites fermentados adicionados de polpa de maná-cubiu, com variação de 0,22 a 1,54 mg EAG/g (Tabela 20). Este aumento foi mais intenso quando a cepa de *L. plantarum* ST8Sh foi usada, provavelmente pela degradação de compostos e liberação de compostos bioativos.

Os leites fermentados apresentaram elevada capacidade de sequestro de radicais DPPH e FRAP, ou seja, elevada atividade antioxidante (Tabela 21). Houve variação de 0,34 a 1,11 µmol Trolox/g da atividade antioxidante quantificada por DPPH, e 0,44 a 1,67 µmol Trolox/g da atividade antioxidante quantificada por FRAP. Ainda, a capacidade de sequestro dos radicais livres foi maior ou igual ao controle quando a polpa de maná-cubiu foi adicionada.

Os carotenoides presentes na polpa de maná-cubiu (licopeno, β-caroteno e luteína) demonstraram uma potente ação de sequestro do radical peroxila, enquanto os compostos fenólicos apresentaram uma grande eficiência em desativar peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

Tabela 20. Teores de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante o período 28 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	Tempo (dias)		
	1	14	28
Adicionado de polpa			
LP	0,63 ± 0,03 ^{Ab}	0,66 ± 0,03 ^{Ab}	1,54 ± 0,43 ^{Aa}
ST	0,23 ± 0,01 ^{Bb}	0,28 ± 0,08 ^{Bb}	0,48 ± 0,08 ^{Ba}
LP + ST	0,22 ± 0,00 ^{Bc}	0,32 ± 0,01 ^{Bb}	0,46 ± 0,03 ^{Ba}
Controle			
LP	0,18 ± 0,05 ^{Bb}	0,22 ± 0,01 ^{Bb}	0,54 ± 0,01 ^{Ba}
ST	0,17 ± 0,03 ^{Bb}	0,21 ± 0,02 ^{Bb}	0,52 ± 0,06 ^{Ba}
LP + ST	0,15 ± 0,01 ^{Bb}	0,19 ± 0,01 ^{Bb}	0,45 ± 0,00 ^{Ba}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST 080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

O aumento da atividade antioxidante durante o armazenamento ocorre porque a fermentação induz a quebra estrutural das paredes celulares da planta, levando a liberação de vários compostos antioxidantes. Durante a fermentação também acontece uma reação de hidrólise microbiana, o que aumenta a quantidade de compostos antioxidantes no leite fermentado (HUR *et al.*, 2014). Busanello *et al.* (2019) analisaram leite fermentado com o probiótico *L. plantarum* adicionado de farinha de banana verde, e em 40 h de fermentação obteve 0,31 ± 0,05 µmol Trolox/mL, pelo método DPPH, inferior ao observado no presente trabalho.

5.7.3 Carotenoides em leite fermentado

Não foi possível quantificar os carotenoides em leite fermentado, provavelmente, a quantidade de polpa de maná-cubiu (3%) adicionada ao leite fermentado foi insuficiente para ser detectada pelo método proposto neste trabalho. Ainda, a quantidade de carotenoides pode ter sido degradada durante a fermentação do leite pelas BAL. Os carotenoides são degradados pela oxidação dos alimentos, são instáveis ao pH e ao aquecimento. Devido à instabilidade ao pH e ao aquecimento

dos alimentos, os carotenoides são degradados e transformados para a forma cis, resultando em perda de cor (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

5.7.4 Viabilidade celular das BAL em leite fermentado

A população de *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080 reduziu significativamente durante o armazenamento (Tabela 22). No leite fermentado com adição de polpa de maná-cubiu, a viabilidade celular das BAL variou de 12,22 a 10,55 log UFC/mL, enquanto no leite fermentado controle a variação foi de 12,27 a 10,56 log UFC/mL, em geral, os valores foram semelhantes estatisticamente.

A população de *S. thermophilus* ST 080 reduziu significativamente ao longo do tempo, com variação de 11,96 a 9,45 log UFC/mL na presença da polpa e de 12,00 a 8,86 log UFC/mL no tratamento controle. No final do armazenamento, *S. thermophilus* ST8 apresentou maior viabilidade na presença da polpa de maná-cubiu. *S. thermophilus* é pouco tolerante a ambientes ácidos e baixos valores de pH (PENNA *et al.*, 2015), e por isso, a redução da viabilidade pode estar relacionada ao aumento da acidez nos leites fermentados durante a estocagem (Tabela 17).

É importante que a formulação mantenha a atividade e a viabilidade do probiótico durante o período de armazenamento. Alguns vegetais, incluindo principalmente as frutas, podem conter em sua composição compostos com atividade antimicrobiana e excessiva acidez, e estas características reduzem a viabilidade dos probióticos (VINDEROLA *et al.*, 2002). Por outro lado, alguns compostos presentes em vegetais (minerais, vitaminas, fibras dietéticas, antioxidantes, compostos fenólicos e carotenoides) podem favorecer o crescimento das cepas probióticas (REIS *et al.*, 2011; BORGONOV, 2018), conforme observado no leite fermentado com polpa de maná-cubiu.

O crescimento das bactérias probióticas no leite é lento durante a fermentação e a sua taxa de sobrevivência durante o armazenamento é baixa. A adição de substâncias prebióticas e a seleção adequada de culturas iniciadoras (*starters*) melhoram o crescimento das bactérias probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A adição de frutos em produtos fermentados promove o crescimento das BAL e a viabilidade das bactérias permanece no nível bioterapêutico (>6-8 log UFC/mL) (BARAT; OZACAN, 2017).

Tabela 21. Atividade antioxidante de leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), obtido pelo método DPPH e FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$), durante de 28 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g}$)			FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$)		
	Tempo (dias)			Tempo (dias)		
	1	14	28	1	14	28
Adicionado de polpa						
LP	$0,57 \pm 0,02$ ^{Ab}	$0,70 \pm 0,01$ ^{Ab}	$1,11 \pm 0,05$ ^{Aa}	$0,66 \pm 0,01$ ^{Ab}	$0,64 \pm 0,00$ ^{Ab}	$1,56 \pm 0,04$ ^{Aa}
ST	$0,54 \pm 0,07$ ^{Ac}	$0,77 \pm 0,01$ ^{Ab}	$1,05 \pm 0,01$ ^{Aa}	$0,44 \pm 0,00$ ^{Cb}	$0,48 \pm 0,03$ ^{Cb}	$0,95 \pm 0,09$ ^{Ba}
LP + ST	$0,54 \pm 0,01$ ^{Ac}	$0,77 \pm 0,00$ ^{Ab}	$1,05 \pm 0,01$ ^{Aa}	$0,49 \pm 0,13$ ^{Cb}	$0,59 \pm 0,01$ ^{Bb}	$1,57 \pm 0,00$ ^{Aa}
Controle						
LP	$0,45 \pm 0,04$ ^{Bc}	$0,68 \pm 0,00$ ^{Ab}	$1,03 \pm 0,05$ ^{Ba}	$0,51 \pm 0,02$ ^{Bb}	$0,61 \pm 0,00$ ^{Ab}	$1,40 \pm 0,08$ ^{Ba}
ST	$0,44 \pm 0,06$ ^{Bc}	$0,64 \pm 0,01$ ^{Ab}	$0,80 \pm 0,02$ ^{Ca}	$0,51 \pm 0,09$ ^{Bb}	$0,58 \pm 0,04$ ^{Bb}	$1,01 \pm 0,09$ ^{Ca}
LP + ST	$0,34 \pm 0,05$ ^{Cc}	$0,58 \pm 0,00$ ^{Bb}	$0,70 \pm 0,04$ ^{Da}	$0,51 \pm 0,01$ ^{Bb}	$0,53 \pm 0,01$ ^{Bb}	$1,67 \pm 0,10$ ^{Aa}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 22. Viabilidade das BAL (log UFC/mL) em leite fermentado (adicionado de 3 % de polpa de maná-cubiu e controle), durante 28 dias de armazenamento. Resultados expressam as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	Tempo (dias)			
	0	1	14	28
Adicionado de polpa				
LP	12,22 ± 0,02 ^{Ba}	11,76 ± 0,02 ^{Ab}	10,55 ± 0,06 ^{Bc}	9,55 ± 0,06 ^{Bd}
ST	11,96 ± 0,10 ^{Da}	12,03 ± 0,14 ^{Aa}	9,57 ± 0,09 ^{Cb}	9,45 ± 0,06 ^{Bb}
LP + ST	12,22 ± 0,02 ^{Ba}	12,15 ± 0,03 ^{Ab}	10,87 ± 0,01 ^{Ac}	10,55 ± 0,06 ^{Ad}
Controle				
LP	11,97 ± 0,05 ^{Ca}	11,96 ± 0,13 ^{Aa}	10,57 ± 0,13 ^{Bb}	9,53 ± 0,09 ^{Bc}
ST	12,00 ± 0,07 ^{Ca}	12,07 ± 0,15 ^{Aa}	9,51 ± 0,03 ^{Cb}	8,86 ± 0,04 ^{Cc}
LP + ST	12,27 ± 0,06 ^{Aa}	11,97 ± 0,04 ^{Ab}	10,86 ± 0,01 ^{Ac}	10,56 ± 0,10 ^{Ad}

LP – *L. plantarum* ST8Sh; ST – *S. thermophilus* ST 080; LP + ST – *L. plantarum* ST8Sh + *S. thermophilus* ST080. Média de dois processamentos (n=6). ^{A, B, C} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e ^{a, b, c} letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

Desta forma, neste estudo ficou demonstrado que a polpa de maná-cubiu é um bom ingrediente para adição ao leite a ser fermentado por *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080. Além disso, a polpa de maná cubiu, por conter elevado conteúdo de compostos bioativos, pode contribuir para aumentar o valor nutricional de leites fermentados.

6 CONCLUSÕES

A composição físico-química da polpa de maná-cubiu demonstra elevado conteúdo de compostos bioativos (compostos fenólicos, carotenoides e ácido oleico) e atividade antioxidante. O tratamento térmico e adição de ácido cítrico para a conservação da polpa de maná-cubiu teve efeito significativo na retenção dos compostos bioativos. O tratamento térmico a 70°C/7,5 min e adição de 0,75% de ácido cítrico resultou na maior retenção de carotenoides e foi selecionado para conservação da polpa de maná-cubiu. As cepas de *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080 apresentaram elevada viabilidade na presença de polpa de maná-cubiu e foram selecionadas para aplicação em leite fermentado. A polpa de maná-cubiu contém compostos bioativos para adição ao leite a ser fermentado por *L. plantarum* ST8Sh e *S. thermophilus* ST 080. Os leites fermentados probióticos contendo polpa de maná cubiu apresentaram potencial inovador e funcional, com aptidão para proporcionar efeitos benéficos aos consumidores. Estudos adicionais visando a otimização da formulação do produto, avaliação sensorial e dos efeitos benéficos à saúde são desejáveis.

REFERÊNCIAS

- ACHANTA, K.; ARYANA, K.; BOENEKE, C. A. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 424-429, 2007.
- ADIMPONG, D. B.; NIELSEN, D. S.; SORENSEN, K.I.; DERKX, P. M.; JESPERSEN, L. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 75, 2012.
- AKALIN, A. S.; UNAL, G.; DINKCI, N.; HAYALOGLU, A. A. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7 p. 3617-3628, 2012.
- ALBUQUERQUE, M. A. C.; BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; LEBLANC, J. G.; SAAD, S. M. I. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 26–32, 2016.
- ALCOCK, J.; MALEY, C. C.; AKTIPIS, C. A. Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. **Bioessays**, v. 36, n. 10, p. 940-949, 2014.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHAES, C. E. C.; MAIA, G. A. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from Northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.2155-2159, 2011.
- ALVES-RODRIGUES, A; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 57-83, 2004.
- AMARAL, D. F. M.; SILVA, L. F.; CASAROTTI, S. N.; NASCIMENTO, L. C. S.; PENNA, A. L. B. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 933-949, 2017.
- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; LAI, O. S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ANTHON, G. E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N.; BARRETT, D. M. Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6153-6159, 2002.

ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO, T. F.; CARDELLO, H. M. A. B. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado proteico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 105-114, 2004.

AOAC. **Official Method of Analysis**, 996.06: Fat (total, saturated and unsaturated) in foods. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA, 2010.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011.

ASIF, M. Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: Perilla frutescens is a good example of plant oils. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 11, n. 1, p. 51-59, 2011.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – Parte 1. **NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição**, v. 2, n. 3, p. 1-20, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARAT, A.; OZCAN, T. Growth of probiotic bacteria and characteristics of fermented milk containing fruit matrices. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 1, p. 110, 2017.

BARBOSA, A. M. P.; SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, P. N.; GOMES, J. C.; MOTA, A. R. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 309-316, 2006.

BARMAN, S.; GHOSH, R.; MANDAL, N. C. Use of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LABW4 to prevent *Listeria monocytogenes* induced spoilage of Meat. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 22, p. 2115-2123, 2014.

BAÚ, T. R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 8, p. 845-50, 2015.

BAXTER, H.; HARBORNE, J. B.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. Boca Raton: CRC Press, p. 893, 1998.

BECKER, L. V. **Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça**. 2009. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – UFSM, Santa Maria, 2009.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 478p.

BJELAKOVIC, G., NIKOLOVA, D., GLUUD, L. L., SIMONETTI, R. G., GLUUD, C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 14, n. 3, 233-237p, 2012.

BORGES, D. O.; MATSUO, M. M.; BOGSAN, C. S. B.; SILVA, T. F.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 reduces *Listeria monocytogenes* growth and impacts on fatty acids profile and conjugated linoleic acid content in fermented cream. **LWT-Food Science and Technology**, v. 107, p. 264-271, 2019.

BORGONOV, T. F. **Biocompostos das polpas de maracujá e de buriti; caracterização e aplicação em leite**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - UNESP, São José do Rio Preto, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2016. Disponível em: Acesso em: 12 de Jan. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 26 de dezembro 2003 a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de Jun. 2003 b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". Instrução normativa nº 46, de 23 de Outubro de 2007. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, Seção 1, p. 9, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Resolução nº18 de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 1999a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Resolução nº19 de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 1999b.

BRIONGOS, H.; ILLERA, A. E.; SANZ, M. T.; MELGOSA, R.; BELTRÁN, S.; SOLAESA, A. G. Effect of high pressure carbon dioxide processing on pectin

methylesterase activity and other orange juice properties. **LWT - Food Science and Technology**, v.74, n.3, pag. 411–419, 2016.

BUSANELLO, M. **Desenvolvimento, otimização e estabilidade de leite fermentado com bactérias lácticas e farinha de banana verde**. 2016. 127f. Tese (Ciência de alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

BUSANELLO, M.; FILHO, L. M.; GUERGOLETO, K. B.; GARCIA, S. Otimização do crescimento de *Lactobacillus* no leite desnatado adicionado com farinha de banana verde e determinação das propriedades funcionais. **Nutrition & Food Science**, v. 49, n. 2, p. 249-261, 2019.

CAMPOS, D. C. S.; NEVES, L. T. B. C.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUZA, B. O. Post acidification and evaluation of anthocyanins stability and antioxidant activity in açai fermented milk and yogurts (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 5, 2017.

CASTRO, T. M. N.; ZAMBONI, P. V.; DOVADONI, S.; CUNHA NETO, A.; RODRIGUES, L. J. Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 4, pag. 426-36, 2015.

CARDONA-JARAMILHO, J. **Estudio de metabolitos fijos y volátiles em tres morfotipos de cocona (*Solanum sessilliflorum* Dunal) procedentes del departamento del Guaviare**. 2011. 209f. Tesis (Master en Ciencias - Química) - Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2011.

CAREY, C. M.; KOSTRZYNSKA, M.; OJHA, S.; THOMPSON, S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 2, p. 125–132, 2008.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASAROTTI, S. N.; CARNEIRO, B. M.; TODOROV, S. D.; NERO, L. A.; RAHAL, P.; PENNA, A. L. B. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 289-301, 2017.

CASE, R. A.; BRADLEY JUNIOR, R. L.; WILLIAMS, R. R. **Chemical and Physical Methods**, In: American Public Health Association - Standard methods for the examination of dairy products. 15 ed. Washington: APHA. p. 327-404, 1985.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. Caracterização físico-química do suco de acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 10 p, 2004.

CHEN, C.; KONG, A. N. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 318-326, 2005.

CHENG, H. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 938-50, 2010.

CHERIGUENE, A.; CHOUGRANI, F.; BEKADA, A. M. A.; EL SODA, M.; BENSOLTANE, A. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 15, p. 1854-1861, 2007.

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

CHLOPČIKOVA, S.; PSOTOVÁ, J.; MIKETOVÁ, P.; SOUSEK, J.; LICHNOVSKÝ, V.; SIMÁNEK, V. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 18, n. 5, p. 408-413, 2004.

CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 83 -101, 1993.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B. P.; CRUZ, A. G.; CONTE, J., C. A. Leite Fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 9, n. 16, p. 2013-1387, 2013.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruijssem W, Jones R (Eds). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 1250- 1319, 2000.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 93-109, 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

DAS, U. N.; FAMS, M. D. Essential fatty acid as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. **Nutrition**, v. 18, n. 9, p. 786–789, 2002.

DE ANDRADE, M. C.; ANDRADE, J. S. Physicochemical changes in cubiu fruits (*Solanum sessiliflorum* Dunal) at different ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 250-254, 2012.

DATTA, R; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and Technologies - a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n.9, p. 1119-1129, 2006.

DECKER, E. A.; WARNER, K.; RICHARDS, M. P.; SHAHIDI, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4303-4310, 2005.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1062-1071, 2011.

DI CAGNO, R.; MAZZACANE, F.; RIZZELLO, C. G.; ANGELIS, M.; MELONI, M.; SERVI, B. Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSN19463: functional grape must beverage and dermatological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 731-741, 2010.

DOS SANTOS, R. A.; JORDÃO JÚNIOR, A. A.; VANNUCCHI, H.; TAKAHASHI, C. S. Protection of doxorubicin-induced DNA damage by sodium selenite and selenomethionine in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 6, p. 343-348, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ESPIRITO-SANTO, A. P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 393-399, 2012.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FACHIN, D.; LOEY, A.; BINH, L. N.; VERLENT, I.; INDRAWATI; HENDRICKX, M. Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 4, n. 2, p. 135-142, 2003.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos**: atualização e prospecção. 2 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2018, 206 p.

FERREIRA, I. C. R. F.; MARTINS, N.; BARROS, L. Phenolic compounds and its bioavailability: in vitro bioactive compounds or health promoters. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 82, p. 1–44, 2017.

FERREIRA, R. L. **Avaliação dos processos de secagem e de extração de compostos antioxidantes em farinhas de resíduos de frutas e hortaliças**. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - UFRJ, Rio de Janeiro, 2015.

FERREIRA, R.M.A.; AROUCHA, E.M.M.; SOUZA, P.A.; QUEIROZ, R.F.; PONTES FILHO, F.S.T. Ponto de colheita da acerola visando à produção industrial de polpa. **Revista Verde**, v.4, n.2, p.13-16, 2009.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 52, p. 35-50, 2013.

FUJITA, E. **Temperatura, embalagem e radiação gama na conservação pós colheita de maná cubiu**. 2011. 75f. Tese (Doutorado em Agronomia) – UNESP, Botucatu, 2011.

FUJITA, E.; LOPES, R. V.; CAMPOS, A. J. Avaliação enzimática na pós-colheita do maná cubiu tratados com radiação gama. **Revista Agroambiente Online**, v. 6, n. 1, p. 53-58, 2012.

FUJITA, E.; VIEITES, R., L; DAIUTO, E. R. Qualidade dos frutos de maná-cubiu minimamente processados submetidos a dois tipos de corte e diferentes concentrações de ácido ascórbico. **Revistas Científicas de América Latina y el Caribe**, v. 14, n. 2, p. 238-244, 2013.

FURLANETO, K. A. **Qualidade nutricional e aceitabilidade da geléia convencional e light de maná-cubiu**. 2015. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - UNESP, Botucatu, 2015.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R. W.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A; REID, G. The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 391-398, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMEZ-CACERES, L. P. **Otimização da desidratação do fruto do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) utilizando solução osmótica ternária**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) -INPA/UFAM, Manaus, 2010.

GREEN, K. N.; MARTINEZ-CORIA, H.; KHASHWJI, H.; HALL, E. B.; YURKO-MAURO, K. A.; ELLIS, L.; LAFERLA, F. M. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid- β and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. **Journal Neuroscience**, v.16, n. 27, p. 4385–4395, 2007.

HERNANDES, L. C. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal**. 2013. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – USP, Ribeirão Preto, 2013.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365-373, 2001.

HUANG, D; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUNTERLAB. **User's manual with universal software versions 3.5**. Reston: HunterLab, 1998.

HUR, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, Y. C.; CHOI, I.; KIM, G. B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, n.10, p. 346-356, 2014.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: IAL, 2008.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; PAULA, A. T.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. G. M.; PENNA, A. L. B. Potential beneficial properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 141-156, 2014.

JORGE, N. **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação. 2009. 165 p.

KATO-KATAOKA, A.; NISHIDA, K.; TAKADA, M.; SUDA, K.; KAWAI, M.; SHIMIZU, K.; KUSHIRO, A.; HOSHI, R.; WATANABE, O.; IGARASHI, T.; MIYAZAKI, K.; KUWANO, Y.; ROKUTAN, K. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 2, p. 153-156, 2016.

KINUPP, V. **Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007. 592 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - UFRGS, Porto Alegre, 2007.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1990-1995, 2003.

KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. 2. ed. Campinas: Emopi, 214 p., 2002.

KOBA, K.; YANAGITA, T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 8, n. 6, p. 525–532, 2014.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Probiotics for infectious diseases: More drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 4, p. 288–296, 2012.

KUS-YAMASHITA, M. M. M.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos. 2º ed. São Paulo: **ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**, vol. 17, 2017.

LEBLANC, J. G.; TARANTO, M. P.; MOLINA, V.; SESMA, F. B-group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. (Ed.). **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. Ames: Wiley-Blackwell, p. 211-232, 2010.

LEE, W.; LUCEY, J. A. Formation and Physical Properties of Yogurt. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 23, n. 9, p. 1127-1136, 2010.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 69-75, 2002.

LEONTOWICZ, M.; LEONTOWICZ, H.; DRZEWIECKI, J.; JASTRZEBSKI, Z.; HARUENKIT, R.; POOVARODOM, S.; PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; KANG, S. G.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Two exotic fruits positively affect rat's plasma composition. **Food Chemistry**, v. 102, n. 11, p. 192-200, 2007.

LIRA JÚNIOR, J. S.; MUSSER, R. S.; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LEDERMAN, I. E.; SANTOS, V. F. Caracterização física e físico-química de frutos de cajá-umbu (*Spondias* spp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 757-761, 2005.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1028-1038, 2008.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo "in natura")**. São Paulo: Instituto Platarum de Estudos da Flora, 2006, 672 p.

MACEDO, S. H. M. **Caracterização físico-química e nutricional da polpa de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) para aproveitamento industrial**. 1999. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – UAM, Manaus, 1999.

MAIA, J. R. P.; SCHWERTZ, M. C.; SOUSA, R. F. S.; AGUIAR, J. P. L.; LIMA, E. S. Efeito hipolipemiante da suplementação dietética com a farinha do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) em ratos hipercolesterolêmicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 112-119, 2015

MÄKELÄINEN, H.; FORSSTEN, S.; SAARINEN, M.; STOWELL, J.; RAUTONEN, N.; OUWEHAND, A. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 81-91, 2010.

MANDELLI, F. **Bactéria termófila *Thermus filiformis*: produção de carotenoides e avaliação da capacidade antioxidante**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – UNICAMP, Campinas, 2010.

MARAFON, A. P.; SUMI, A.; ALCÂNTARA, M. R.; TAMIME, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 511-519, 2011.

MARAGKOUDAKIS, P. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 3, p. 189-199, 2006.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit of *Solanum sessiliflorum*. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A**, v. 206, n. 5, p. 364-366, 1998.

McNULTY, H. P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S. F.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 1, p. 167-174, 2007.

MENDES, C. M. P. **O benefício do consumo de prebióticos para a saúde**. 2012. 38 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição) – UNICEUB, Brasília, 2012.

MENDONÇA, C. V. C. E.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; MORAIS, A. R. Quantificação de polifenóis e digestibilidade protéica de famílias de feijoeiro comum. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 858-864, 2003.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-24, 2004.

MOREIRA, I. S.; CASTRO, D. S.; SILVA, L. M. M.; SOUSA, F. C.; SILVA, W. P. Elaboração e avaliação das características físicas e físico-químicas de preparo misto de buriti e pupunha. **Revista Educação Agrícola Superior**, v. 29, n. 2, p.77-80, 2014.

MORETTI, B. R. **Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura láctica em iogurtes**. 2009. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – UNESP, São José do Rio Preto, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Review: extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NASCIMENTO, L. C. S.; CASAROTTI, S. N.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. Probiotic potential and safety of enterococci strains. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 241 -252, 2019.

NISHINO, H.; TOKUDA, H.; MURAKOSHI, M.; SATOMI, Y.; MASUDA, M.; ONOZUKA, M. Cancer prevention by natural carotenoids. **Biofactors**, v. 13, n. 1-4, p. 89-94, 2000.

NOGUEIRA, J. P.; JESUS, M. A. C. L. Desenvolvimento, avaliação físico-química, sensorial e colorimétrica da geleia de seriguela diet. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, p. 1531-1544, 2014.

O'CONNOR, E. B.; BARRETT, E.; FITZGERALD, G.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. In: TAMIME, A. Y. **Probiotic dairy products**. Blackwell Publishing Ltda. p. 167-194, 2005.

O'RELL, K. R.; CHANDAN, R. C. Yogurt: fruit preparations and flavouring materials. In: CHANDAN, R. C. (Ed.). **Manufacturing Yogurt and Fermented Milks**. Iowa: Blackwell Publishing, p. 151-166, 2006.

OKONOGI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 839-846, 2007.

OLIVEIRA, H. P. **Elaboração de nectar de cubú (Solanum sessiflorum Dunal) e avaliação das características físico-químicas e sensoriais durante o armazenamento**. 1999. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – UAM, Manaus, 1999.

OLIVEIRA, R. P. S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M. N. CONVERTI, A. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 520-523, 2012.

OLIVER, J. D. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 42 p, 2001.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. S. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MIGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 294 p.

OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E.; HE, F.; HASHIMOTO, H.; BRENNON, Y.; SALMINEN, S. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 144-145, 2001.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. B. Clinical appliance of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection - A brief review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 5, p. 429-437, 2014.

PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. CHOISET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 1-13, 2014.

PENNA, A. L. B.; GURRAM, S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Effect of milk treatment on acidification, physicochemical characteristics, and probiotic cell counts in low fat yogurt. *Milchwissenschaft*, v. 62, n. 1, p. 48-52, 2007.

PENNA, A. L. B.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; SILVA, L. F.; DIAMANTINO, V. R.; TODOROV, S. D. Overview of the functional lactic acid bacteria in the fermented milk products, 2015. In: Ravishankar, R, V.; Jamuna, B. A. (Eds.). *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods* (p. 113-148). Boca Raton: CRC Press, p. 148, 2015.

PERES, C. M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDONZA, A.; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic

acid bacteria with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, p. 31-42, 2012.

PEREIRA, Z. R. F. **Efeito hipoglicêmico da fibra do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) em ratos diabéticos**. 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - UAM, Manaus, 2001.

PEREIRA, J. M. A. T. K.; OLIVEIRA, K.A.M.; SOARES, N.F.F.; GONÇALVES, M.P.J.C.; PINTO, C. L. O.; FONTES, E. A. F. Avaliação da qualidade físico-química, microbiológica e microscópica de polpas de frutas congeladas comercializadas na cidade de Viçosa-MG. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 437-442, 2006.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

PIGOLI, D. R.; VIEITES, R. L.; DAIUTO, E. R. Alterações nutricionais em casca e polpa de cenoura decorrentes de diferentes métodos de cozimento. **Energia na Agricultura**, v. 29, n. 2, pag. 121-127, 2014.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais**: Introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela, 2005.

POURAHMAD, R.; ASSADI, M. M. Yoghurt production by Iranian native starter cultures. **Nutrition & Food Science**, v. 35, n. 6, p. 410-415, 2005.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – USP, Piracicaba, 2009.

PRESTON, R. J. Epigenetic processes and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 616, n. 1-2, p. 7-10, 2007.

RAMFUL, D.; TARNUS, E. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of *Mauritian citrus* fruit pulps. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2088-2099, 2011.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 619-625, 2012.

RAO, A.; RAO, L. Carotenoids an human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207 – 216, 2007.

RENES, E.; LINARES, D. M.; GONZÁLEZ, L.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E.; STANTON, C. Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. **Journal of Functional Foods**, v. 34, n. 7, p. 340-346, 2017.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124-140, 2012.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. **Probióticos e seus efeitos terapêuticos na saúde humana**. São José do Rio Preto: Cultura Acadêmica Editora, 2011.

RODRIGUES, E. **Capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio por carotenoides e extrato de maná-cubiu**. 2012. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Alimentos) – UNICAMP, Campinas. 2012.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, na unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacity against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12 p. 3022–3029, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides**: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: MMA/SBF, 101 p., 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, D. C.: International Life Sciences Institute Press, 71 p., 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Harvest Plus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC e Cali: IFPRI e CIAT. Harvest Plus Technical Monograph, ed. 2, 58p, 2004.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMONDI, S. Folate production by probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 3, n. 1, p. 118-134, 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical, **Comunicado Técnico**, 127, Fortaleza, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico**, 125, Fortaleza, 2006.

RYDLEWSKI, A. A.; MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; CLAUS, T.; VAGULA, J. M.; SILVA, M. C.; SANTOS JUNIOR, O. O.; VISENTAINER, J. V. Bioactive compounds, antioxidante capacity, and fatty acids in different parts of four unexplored fruits. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p.1-9, 2017.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIÉ, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT—Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p.1–16, 2013.

SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; OLIVEIRA, R. P. S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, n. 10, p. 527-536, 2014.

SALICK, J. Crop domestication and the evolutionary ecology of cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Evolutionary Biology**, v. 26, p. 247-285, 1992.

SALMINEN, S.; WON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects**. 3^{ed}. Boca Raton: CRC Press, 2004.

SALOTTI DE SOUZA, B. M.; BORGONOV, T. F.; CASAROTTI, S. N.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2; p. 382–396, 2019.

SÁNCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C. G. L.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 472-483, 2009.

SANTOS, C. L. A. **Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo Parmesão**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UNESP, São José do Rio Preto, 2015.

SANTOS, R. B; BARBOSA, L. P. J. L; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 26-38, 2011.

SANTOS, V.; ARAUJO, W.; TEIXEIRA, R.; NASCIMENTO, J.; BITTENCOURT, C.; BOULLOSA, C. **Escurecimento Enzimático em Frutas**. VII Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação - Tocantins, 2012.

SARAVANAN, P.; DAVIDSON, N. C. The role of ômega-3 fatty acids in primary prevention of coronary artery disease and in atrial fibrillation is controversial. **JACC**, v. 55, n. 4, p. 410-411, 2010.

SCHUELTER, A. R.; GRUNVALD, A. K.; AMARAL, A. T. J.; DA LUZ, C. L; LUZ, C. L; GONÇALVES, L. M; STEFANELLO, S; SCAPIM, C. A. In vitro regeneration of cocona (*Solanum sessiliflorum*, *Solanaceae*) cultivars for commercial production. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 963-975, 2009.

SEGUI, S. J. M. Androgenesis in Solanaceae. **Methods in Molecular Biology**, v. 1359, n. 1, p. 209-244, 2016.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; F. REMIZE; P. POUCHERET. 2018. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. **Food Research International**, v. 104, n. 2, p. 86–99, 2018.

SERENO, A. B. **Caracterização físico-química e potencial antioxidante do maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) cultivado na Mata Atlântica do Estado do Paraná**. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Nutricional) – UFPR, Curitiba, 2017.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHAMI, N. J. I. E; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHIMOYAMA, A. T.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; OLIVEIRA, A. M. S.; PEREIRA, I. L. M.; MANCINI, J. F.; FARSKY, S. H. P. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 1, p. 5-14, 2013.

SILVA FILHO, D. F. Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal: uma planta medicinal nativa da Amazônia em processo de seleção para o cultivo em Manaus, Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 5, n. 2, p. 65-70, 2003.

SILVA FILHO, D. F. **Discriminação de etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal Solanaceae) da Amazônia, com base em suas características morfológicas e químicas**. 2002. 117 f. Tese (Doutorado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - INPA/UFAM, Manaus, 2002.

SILVA FILHO, D. F. **Variabilidade genética em 29 populações de cubiu (*Solanum topiro* H e B Solanaceae) avaliada na zona da mata do estado de Pernambuco**. 1994. 80 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - UFRPE, Recife, 1994.

SILVA FILHO, D. F.; ANDRADE, J. S.; CLEMENT, C. R. MACHADO, F. M.; NODA, H. Correlações fenotípicas, genéticas e ambientais entre descritores morfológicos e químicos em frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 29, n. 4, p. 503-511, 1999.

SILVA FILHO, D. F.; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J.; NODA, H.; REIS, O. V. Variabilidade genética em populações naturais de cubiu da Amazônia. **Horticultura Brasileira**, v.14, n.1, p.9-15, 1996.

SILVA FILHO, D. F.; MACHADO, F. M. **Coconas (*Solanum sessiliflorum* Dunal)**. In: CARDOSO, M. O. Hortalizas no convencionales del Amazonas. Brasília, DF: Embrapa SPI; Manaus: Embrapa-CPAA, p. 97-104, 1997a.

SILVA FILHO, D. F.; MACHADO, F. M. **Hortaliças de frutos**. In: CARDOSO, M. O. Hortaliças Não-Convencionais da Amazônia. Brasília: Embrapa. p. 97-104, 1997b.

SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, M. C.; MARTINS, L. H. P. Caracterização e avaliação do potencial agrônomo e nutricional de etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 4, p. 399-406, 2005.

SILVA FILHO, D. F.; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J.; NODA, H.; REIS, O. V. Seleção de caracteres correlacionados em Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando a análise de trilha. **Acta Amazônica**, v. 27, n. 4, p. 229-240, 1997.

SILVA, K. M. S. **Avaliação comportamental do potencial efeito de *Bifidobacterium lactis* HN019 em modelo animal de depressão e ansiedade**. 2017. 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – UNOPAR, Londrina, 2017.

SILVA, C. J. **Desenvolvimento de preparado de fruta com massa base de casca de maracujá e aplicação em iogurte**. 2015. 76 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – IMT, São Caetano do Sul, 2015.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – UNESP, São José do Rio Preto, 2010.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SOCCOL, C. R.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P.; RIGON SPIER, M.; PEDRONI MEDEIROS, A. B.; YAMAGUSHI, C. T.; DE DEA E LINDNER, J.; PANDEY, A. THOMAZ-SOCCOL. V. The potential of probiotics: a review. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SODINI, I.; LUCAS, A.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2005.

SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE, G.; LEMMETTI, F.; GIUDICI, P. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 240-249, 2014.

SOUZA, B. A. A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.)**. 2009. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UFRN, Natal, 2009.

SOUZA, A. E. S. G. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – USP, São Paulo, 2008.

SOUZA, B. M. S. S. **Avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* autóctones e aplicação em leites fermentados com diferentes matrizes**. 2015. 123f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - UNESP, São José do Rio Preto, 2015.

SOUZA, J. C.; TAVARES, D. Q. **Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de suco de uva e da norbixina**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – UNICAMP, Campinas, 2008.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, n. 2, p. 101-107, 2005.

STANNER, S. A.; HUGHES, J.; KELLY, C. N. M.; BUTTIRIS, J. A review of the epidemiological evidence for the "antioxidant hypothesis". **Public Health Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 407-422, 2003.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 381-388, 2007.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100-110, 2004.

TILLISCH, K.; LABUS, J.; KILPATRICK, L.; JIANG, Z.; STAINS, J.; EBRAT, B.; GUYONNET, D.; LEGRAIN-RASPAUD, S.; TROTIN, B.; NALIBOFF, B.; MAYER, E. A. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1394-1401, 2013.

TODOROV, S. D.; HOLZAPFEL, W.; NERO, L. A. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action. **Annals of Microbiology**, v. 66, n.3, p. 949–962, 2016.

TORRES, V. **Determinación del potencial nutritivo y funcional de guayaba (*Psidium guajava* L.), cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) y camu (*Myrciaria dubia* Vaugh).** 2010. 121 f. (Ingeniera Agroindustrial) - Escuela Politécnica Nacional, Quito, 2010.

TRIBESS, T. B. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado.** 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – USP, São Paulo, 2003.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 9, p. 1328-1335, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Jornal Internacional de Bioquímica e Biologia Celular**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to biactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 7, p. 579-589, 2002.

VINDEROLA, G.; CÉSPEDES, M.; MATEOLLI, D.; CÁRDENAS, P.; LESCANO, M.; AIMARETTI, N.; REINHEIMER, J. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 2, p. 269-275, 2011.

VÍTOLO, H. F.; SOUZA, G. M.; SILVEIRA, J. Cross-scale multivariate analysis of physiological responses to high temperature in two tropical crops with C3 and C4 metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 80, n. 1, 2012.

WALLACE, T. C.; GUARNER, F.; MADSEN, K.; CABANA, M. D.; GIBSON, G.; HENTGES, E.; SANDERS, M. E. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 7, p. 392–403, 2011.

WARD, R. E; NIÑONUEVO, M.; MILLS, D. A.; LEBRILHA, C. B.; GERMAN, J. B. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gassier*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4497-4499, 2006.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P.; MACEDO, S. H. M.; GIOIA, T.; SILVA FILHO, D. F. Composição centesimal de diversas composições de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Estação Experimental do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, INPA. In: **Anais do II Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**. Campinas, 1997.

YUYAMA, L. K. O.; MACEDO, S. H. M.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. S.; YUYAMA, K.; FAVARO, D. I. T.; VASCONCELOS, M. B. A. Quantificação de macro e micro nutrientes em algumas etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Acta Amazônica**, v. 37, n. 3, p.425-430, 2007.

ZHANG, H.; XIE, L.; ZHANG, W. L.; ZHOU, W.; SU, J.; LIU, J. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 114-120, 2013.

ANEXO A:



VI Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos
03 a 07 de dezembro de 2018
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
São José do Rio Preto, SP



EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO FRUTO MANÁ-CUBIU (*Solanum sessiliflorum* Dunal) COM DIFERENTES SOLVENTES

Aline Sousa Silva¹; Odilon França de Oliveira Neto²; Ana Lúcia Barretto Penna¹

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
ssousalline@hotmail.com; analucia@unesp.br

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
odiloneto@hotmail.com

RESUMO – O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um fruto amazônico rico em compostos bioativos, vitaminas, minerais e fibras. Possui compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas, que apresentam propriedades medicinais relacionadas aos compostos bioativos presentes na polpa e na casca. Para a obtenção dos compostos fenólicos, a extração, a seleção de solventes e as condições de extração são vitais para a separação, purificação e identificação desses compostos. Este trabalho teve como objetivo preparar polpa de maná-cubiu e estabelecer a maior extração de compostos fenólicos totais (CFT) usando os solventes: metanol, acetona e água milli-Q. A extração dos compostos fenólicos foi realizada a temperatura ambiente, de modo sequencial, usando quatro condições de extração: 1 - metanol 50%, seguido de acetona 70%; 2 - etanol 70%, seguido de acetona 50%; 3 - duas extrações com metanol 100%; 4 - duas extrações com acetona 100%. O teor de compostos fenólicos totais foi quantificado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de polpa. O teor de CFT variou de 1,09 a 2,16 mg EAG g⁻¹. A maior concentração foi obtida utilizando metanol 50% seguido de acetona 70%, e a menor concentração foi obtida com 2 extrações com acetona 100%. As condições de extração testadas apresentaram diferentes eficiências extratoras que foram testadas pelo teste de Tukey, a nível de 5% de significância.

ABSTRACT – The mana-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) is an Amazonian fruit rich in bioactive compounds, vitamins, minerals and fibers. It contains phenolic compounds, carotenoids and vitamins, which have medicinal properties related to the bioactive compounds present in their pulp and peel. In order to obtain the phenolic compounds, extraction, solvent selection and extraction conditions are vital for the separation, purification and identification of these compounds. The objective of this research was to produce mana-cubiu pulp and establish the highest

total phenolic compounds (TPC) extraction using the solvents: methanol, acetone and milli-Q water. The extraction of phenolic compounds was performed sequentially at room temperature using four extraction conditions: 1 - 50% methanol, followed by 70% acetone; 2 - 70% ethanol, followed by 50% acetone; 3 - two extractions with 100% methanol; 4 - two extractions with 100% acetone. The content of total phenolic compounds was quantified by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, and the results were expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of pulp. The TPC content ranged from 1.09 to 2.16 mg GAE g⁻¹. The highest concentration was obtained using 50% methanol followed by 70% acetone, and the lowest concentration was obtained with 2 extractions with 100% acetone. The extraction conditions tested showed different extractive efficiencies that were tested by the Tukey test at a 5% level of significance.

INTRODUÇÃO

O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um fruto de origem amazônica, pertence à família Solanaceae. É um fruto suculento de sabor ácido e aroma agradável, considerado fonte de vitaminas, minerais e fibras. Na região amazônica é consumido *in natura* ou utilizado no preparo de alimentos diversos, tais como sucos, sorvetes, compotas, doces etc. Acredita-se que este fruto apresenta propriedades medicinais, sendo utilizado popularmente para o controle do colesterol, triglicerídeos, anemia, diabetes, entre outros males. Apesar de ser utilizado pela população local para esse fim, existem poucos estudos que comprovem seus efeitos benéficos (SILVA FILHO et al., 1997). Yuyama et al. (2005) avaliaram a influência do cubiu sobre a concentração sérica de glicose em ratos diabéticos. Os ratos que receberam o cubiu apresentaram uma redução de glicose no sangue ao final da 4ª semana de tratamento, quando comparado com o grupo controle. Os autores constataram ação hipoglicemiante do fruto maná-cubiu.

As propriedades medicinais do maná-cubiu podem estar relacionadas ao seu conteúdo de compostos bioativos, tal como β -caroteno, que apresentam correlação com a atividade antioxidante. O β -caroteno possui atividade pró-vitamina A e atividade antioxidante. Esta atividade está relacionada com a capacidade de sequestrar os radicais livres, como o oxigênio singlete e os radicais peroxil (CARDONA-JARAMILLO, 2011).

Há uma grande variedade de compostos químicos com propriedades bioativas, com a presença de diversas classes química, tais como vitaminas, ácidos graxos, carotenoides, compostos fenólicos etc. (GURIB-FAKIM, 2006).

Na polpa do maná-cubiu (CEAGESP/SP) foram identificados 5 compostos fenólicos e 17 carotenoides, sendo os majoritários all-trans- β -caroteno (7,15 μ g/g de polpa), all-trans-luteína (2,41 μ g/g de polpa), 9 cis-luteoxantina (1,33 μ g/g de polpa), all-trans-luteoxantina (1,30 μ g/g de polpa) e all-trans-violaxantina (0,98 μ g/g de polpa) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

A grande variedade de compostos químicos com propriedades bioativas implica em um grande desafio para o desenvolvimento de metodologias eficientes para a extração, identificação e quantificação desses compostos. A etapa de extração é primordial para a obtenção de compostos químicos; a escolha de uma técnica adequada é determinante para a separação, purificação e identificação de compostos bioativos, bem como evitar perdas e ou degradação dos compostos termolábeis (DAI; MUMPER, 2010; GURIB-FAKIM, 2006; SASIDHARAN et al., 2011).

A técnica de extração sólido-líquido é amplamente utilizada para extrair compostos químicos de plantas, devido à sua simplicidade e eficiência. O método consiste na extração de

componentes solúveis através do contato direto da matriz sólida com o solvente utilizado, sendo útil no preparo de extratos de origem vegetal. Para maior eficiência na extração, a matriz vegetal é processada com o objetivo de aumentar a área superficial, tais como: maceração, trituração, pulverização, entre outras (DUTTA, 2007; IGNAT et al., 2011; THEODORE; RICCI, 2010).

Outro fator crítico para eficiência da extração é a seleção adequada de solventes que devem ter pureza, polaridade e seletividade adequadas, compatíveis com as propriedades físicas e químicas dos compostos a serem extraídos (AJILA et al., 2011; GARCIA-SALAS et al., 2010; OTSUKA, 2006).

O objetivo do trabalho foi estabelecer a condição de extração usando os solventes metanol, acetona e água milli-Q que resulte na maior extração de compostos fenólicos totais (CFT).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da Polpa de Maná-Cubiu

Os frutos de maná-cubiu foram adquiridos na CEAGESP, SP. Os frutos foram lavados em água corrente e submersos em solução aquosa de hipoclorito de sódio (NaClO) a 10% em temperatura ambiente, por 10 minutos. Foram retiradas as cascas e pedúnculos manualmente. Para evitar o escurecimento da polpa, os frutos foram imergidos em uma solução de ácido cítrico com pH 4,0 por 1 minuto. A polpa foi triturada, adicionada de 0,5% de ácido cítrico e pasteurizada a 70 °C por 5 minutos em multiprocessador (Thermomix, Vorwerk, Cloyes-sur-le-Loir, França) e passada em tamis de inox de 1,68 mm (ABNT 12) para a retirada das sementes. As polpas foram preparadas em quadruplicata, embaladas a vácuo em sacos de polietileno e armazenadas a -20 °C até o momento da sua utilização.

Extração dos Compostos Bioativos

A extração dos compostos foi realizada em triplicata, de acordo com Rufino et al. (2007), Paz et al. (2015) e Zhao e Shah (2014), com modificações. A extração dos compostos fenólicos foi realizada a temperatura ambiente, de modo sequencial, usando quatro condições de extração: 1 - metanol 50%, seguido de acetona 70%; 2 - etanol 70%, seguido de acetona 50%; 3 - duas extrações com metanol 100%; 4 - duas extrações com acetona 100%.

Para a extração, foi pesado aproximadamente 2,5 g da polpa de mana cubiu em tubo de falcon, em seguida adicionado 10 mL do solvente extrator, conforme o tratamento, homogeneizado, e colocado em repouso por uma hora, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, a mistura de polpa e solvente foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos em centrifuga (THERMO modelo SL 8, Thermo Fisher Scientific, [Waltham, EUA](#)). O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o resíduo sólido foi submetido a nova extração com segundo solvente, conforme o tratamento. O sobrenadante da segunda extração foi recolhido no mesmo balão volumétrico e completado o volume com água Mili-Q. A composição final obtida após avolumação foi 40% do solvente 1, 40% do solvente 2 e 20% de água Mili-Q.

Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação do teor de CFT foi realizada, em triplicata, pelo método de Folin-Ciocalteu, modificado por Ramful e Tarnus (2011). Resumidamente, 250 µL do extrato foi adicionado a 3,5 mL de água MiliQ em tubo de ensaio e misturados com 250 µL de reagente fenólico de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, 1000 µL de carbonato de sódio 20 % (m/v) foi

adicionado a mistura, agitado em vortex (Nova Instruments, Piracicaba, Brasil) e incubado em banho maria (Fisatom, São Paulo, Brasil) a 40 °C por 40 min ao abrigo da luz. O branco foi preparado em conjunto com a amostra, do mesmo modo que a amostra, sendo o extrato substituído por água. A absorbância foi medida em 685 nm em espectrofotômetro UV/VIS modelo Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, [Waltham, EUA](#)). O teor de CFT foi estimado usando uma curva analítica preparada a partir de soluções com diferentes concentrações de ácido gálico, na faixa de concentração de 5,0 a 100 mg L⁻¹. A relação linear foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados (regressão linear), e a linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação (r^2). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de polpa.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e comparação entre as médias pelo teste de Tukey, a nível de 5% de significância, utilizando o programa Statistic 12.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a curva analítica de calibração de ácido gálico (mg) versus absorbância. A curva analítica apresentou excelente linearidade, com coeficiente de correlação $r^2 = 0,999$. Os critérios para aceitação da curva analítica seguem normas estabelecidas por guias de validação, publicados por agências reguladoras oficiais. Segundo este guia, a correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98, condição satisfeita para a curva obtida (BRASIL, 2003).

Figura 1: Curva padrão de ácido gálico.

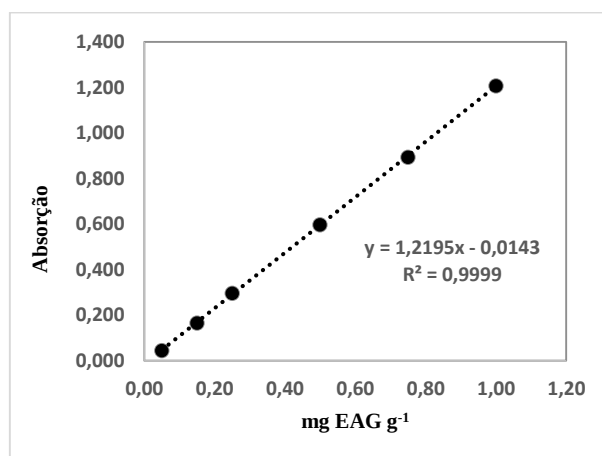


Tabela 1: Teor de compostos fenólicos totais extraídos da polpa do fruto de maná-cubiu (n = 3) com diferentes solventes.

Extrator	CFT
	[mg EAG g ⁻¹]
1 - metanol 50% + acetona 70 %	2,16 ± 0,00 ^a
2 - metanol 70% + acetona 50 %	2,09 ± 0,01 ^b
3 - metanol 100% + metanol 100%	1,26 ± 0,01 ^c
4 - acetona 100% + acetona 100%	1,09 ± 0,00 ^d

Letras diferentes indicam ordens estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os valores CFT extraídos da polpa foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de polpa (mg EAG g⁻¹), a Tabela 1 traz os valores obtidos pelas soluções extratoras, e a comparação entre as médias a 5% de significância ($p < 0,05$).

A análise de variância indicou que as condições afetaram a extração dos CFT das polpas de maná-cubiu, em nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$). Na Tabela 1, a condição 1 (metanol 50% + acetona 70 %) resultou no maior teor de CFT ($2,16 \pm 0,01$ mg EAG g⁻¹), enquanto a condição 4 (acetona 100% + acetona 100%) resultou no mais baixo teor de CFT ($1,09 \pm 0,01$ mg EAG g⁻¹).

Diferentes autores relataram que o uso de solventes com diferentes polaridades é melhor quando comparado aos solventes puros, semelhante ao obtido neste trabalho. Vizzotto e Pereira (2011) testaram a capacidade de extração com solventes com variada polaridade e com solventes puros e misturados. Os resultados mostraram que solventes puros são menos eficientes (teor de CFT inferiores) para a extração dos CFT do que os apresentados pela mistura de solventes polares. Os autores afirmam que a solução extratora composta por de metanol 45%, acetona 45% e etanol 10% resultaram em maior concentração de CFT (1022 mg EAG/100g).

Rockenbach et al. (2008) testaram a capacidade extrativa dos solventes água, etanol 70% e acetona 50% em bagaço de uva. Os autores afirmam que as soluções aquosas apresentaram maior capacidade de extração de CFT em relação ao solvente puro, o extrator acetona 50% apresentou 7,95 g EAG/100 g de peso seco, sendo a maior concentração de CFT encontrada.

Caetano et al. (2009) testaram três soluções aquosas (acetona 80%, etanol 80% e metanol 80%) para extração de CFT em resíduo agroindustrial de acerola. A extração foi realizada em ciclos de extração sequencial em duas temperaturas (25 e 50 °C) para cada extrator. Não foram relatadas diferenças significativas em relação a temperatura de extração; em relação às soluções para a extração, o solvente hidroacetônico 80% resultou em maior concentração de CFT (5,954 µg E catequina mL⁻¹).

CONCLUSÃO

A extração sólido-líquido por contato direto, mostrou-se eficaz para extração dos compostos fenólicos na polpa de maná-cubiu, associada a extração sequencial e variação dos solventes. Para a polpa de maná-cubiu, a utilização dos solventes metanol 50% e acetona 70% em meio aquoso (condição 1) são adequados para extração de compostos bioativos, resultando na maior concentração de CFT (2,16 mg EAG g⁻¹ de polpa).

AGRADECIMENTOS

À UNESP campus São José do Rio Preto e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) campus Barretos, pelo apoio na realização deste trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJILA, C. M. et al. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227-249, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de Jun. 2003.
- CAETANO, A. C. S. et al. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

- CARDONA-JARAMILLO, J. **Estudio de metabolitos fijos y volátiles en tres morfotipos de cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) procedentes del departamento del Guaviare**. 2011. 227 p. Tesis (Master en Ciencias Química) - Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Colombia: UNAL, 2011.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
- DUTTA, B. K. **Principles of mass transfer and separation process**. New Delhi: Prentice-Hall of India Pvt. Ltda, 2007.
- GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813-8826, 2010.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.
- OTSUKA, H. **Purification by solvent extraction using partition coefficient**. In: S. D. Sarker; Z. Latif; A. I. Gray, Editors. Natural products isolation. Ed. 2. Totowa: Humana Press Inc., 2006.
- PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 462-468, 2015.
- RAMFUL, D.; TARNUS, E. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of *Mauritian citrus* fruit pulps. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2088-2099, 2011.
- ROCKENBACH, I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitisvinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28 (supl.), p. 238-244, 2008.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacity against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61 n. 12 p. 3022-3029, 2013.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico, 127, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.
- SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.
- SILVA FILHO, D. F. et al. Seleção de caracteres correlacionados em Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando a análise de trilha. **Acta Amazônica**, v. 27, n. 4, p. 229-240, 1997.
- THEODORE, L.; RICCI, F. **Mass transfer operations for the practicing engineer**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus sp.*): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.

YUYAMA, L. K. O. et al. Estudo da influência do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) sobre a concentração sérica de glicose. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 232-236, 2005.

ZHAO, D.; SHAH, N. P. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 454-462, 2014.