



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



KAROLINE LOBO DE SOUZA

FERMENTAÇÃO LÁTICA DA PIMENTA DE CHEIRO (*Capsicum chinense*) PARA PRODUÇÃO DE PICLES PROBIÓTICO

Feira de Santana, BA

2017

KAROLINE LOBO DE SOUZA

**FERMENTAÇÃO LÁTICA DA PIMENTA DE CHEIRO
(*Capsicum chinense*) PARA PRODUÇÃO DE PICLES
PROBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho
Co-orientadora: Prof. Dr. Elisa Teshima

Feira de Santana, BA

2017

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado

S715f Souza, Karoline Lobo de
Fermentação lática da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) para
produção de picles probiótico / Karoline Lobo de Souza. - 2017.
88 f.: il.

Orientador: Giovani Brandão Mafra de Carvalho.
Coorientadora: Elisa Teshima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de
Santana, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Capsicum chinense*. 2. Pimenta de cheiro – Fermentação lática.
I. Carvalho, Giovani Brandão Mafra de, orient. II. Teshima, Elisa, coorient.
III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.951.4

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristina Maria Rodrigues da Silva
(1º. Examinador)

Prof. Dr. Márcio Inomata Campos
(2º. Examinador)

Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por não me fazer desistir de nada. Nos momentos mais difíceis me iluminou e me fez superar cada desafio.

Aos meus pais, Marivaldo e Ivonete, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Especialmente, a minha mãe que não mediu esforços para me ajudar, lavou os inúmeros materiais sujos e me acompanhou nas análises noturnas, nos fins de semana e nos feriados.

Ao meu irmão, Raphael, pelo carinho e conselhos. Se hoje estou finalizando mais etapa na minha carreira é por incentivo dele.

Ao meu namorado, J. Braúlio, pelo amor e por entender que um processo fermentativo demanda mais atenção.

À minha co-orientadora, Profa. Dr^a Elisa Teshima, pelo projeto, motivação, auxílio em cada etapa e pelas broncas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giovani Brandão, pela oportunidade.

À Profa. Dr^a Geany Camilloto, pela disponibilidade em tirar todas as minhas dúvidas e me auxiliar na análise estatística dos dados da pesquisa.

À Profa. Dr^a Cristina Maria, por ceder o Laboratório de Química de Alimentos para as análises físico-químicas.

Aos Professores Msc. Abraão Peixoto, Msc. Marília Lordêlo, Dr. Renato Souza, Dr^a Fátima Luscher e Msc. Taís Brandão que também contribuíram de alguma forma para a realização do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e os seus professores pelo conhecimento adquirido e pela oportunidade.

À Fundação de amparo à pesquisa do estado da Bahia (Fapesb) pela bolsa concedida.

Aos técnicos Patricia, Vanessa, Patricia Lima e Luis pelo auxílio nas análises.

A amizade e solidariedade de Bruna, Isabel, Jéssica, Natália, Thaís, Thaíse e ao Prof. Angelo Riccell.

Aos colegas e a secretária do Programa pelo suporte.

RESUMO

Pimenta é uma das especiarias mais consumidas no mundo, e a pimenta de cheiro é bastante apreciada por não apresentar ardência e ser de aroma pungente diferenciado. Apresenta uma ampla variedade de compostos antioxidantes, e o sabor, odor, textura e valor nutritivo, constituem atributos de qualidade à sua comercialização. O objetivo do estudo foi realizar a fermentação lática da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) a partir da inoculação de *Lactobacillus plantarum* R1012 para produção de picles, com potencial probiótico, sob a influência da concentração de glicose (0,5, 1 e 2%) e NaCl (4, 5 e 6%). O vegetal submetido ao processo de branqueamento foi fermentado a 20°C por 72 horas e após a fermentação foi armazenamento por 32 dias a 4°C. O crescimento microbiano e o pH foram monitorados durante a fermentação. As contagens microbianas e os valores de pH não revelaram diferenças entre as amostras de salmoura, assim como as contagens de bactérias láticas na pimenta (> 9 Log UFC/mL), após fermentação. Mas, as melhores condições para a elaboração do produto final foram a 2% de glicose, 6% de NaCl e pH 6,5, apresentando níveis de 9,28 Log UFC/mL de bactérias láticas na pimenta, <10 UFC/mL de fungos filamentosos e leveduras, pH de 3,99 e acidez titulável de 0,18%. Ao longo do armazenamento, as bactérias láticas mantiveram-se em níveis acima de 8 Log UFC/mL na pimenta, os fungos diminuíram, assim como o pH, devido à produção de ácido lático. Portanto, o picles é uma alternativa de produto viável para a introdução de ingredientes funcionais como os probióticos.

Palavras-chave: Fermentação da pimenta. Probiótico. *Lactobacillus plantarum*. Armazenamento.

ABSTRACT

Pepper is one of the most consumed spices in the world, and the smell pepper is very appreciated for not presenting ardence and for being of pungent and distinguished aroma. It presents a wide variety of antioxidant compounds, and the taste, odor, texture and nutritional value, constitute attributes of quality to its commercialization. The objective of the study was to carry out the lactic acid fermentation of smell pepper (*Capsicum chinense*) from the inoculation of *Lactobacillus plantarum* R1012 to produce pickles with probiotic potential under the influence of glucose concentration (0.5, 1 and 2%) and NaCl (4, 5 and 6%). The vegetable subjected to the bleaching process was fermented at 20°C for 72 hours and after the fermentation it was stored for 32 days at 4°C. Its microbial growth and its pH were monitored during fermentation. Microbial counts and pH values revealed no differences between the brine samples as well as the lactic acid bacteria counts in the pepper (> 9 Log CFU/mL) after fermentation. However, the best conditions for the preparation of the final product were 2% glucose, 6% NaCl and pH 6.5, presenting levels of 9.28 Log CFU/mL of lactic acid bacteria in the pepper, <10 CFU/mL of filamentous fungi and yeast, pH of 3.99 and titratable acidity of 0.18%. Throughout the storage, lactic bacteria remained at levels above 8 Log CFU /mL in pepper, fungi decreased, as did pH, due to the production of lactic acid. Therefore, the pickles are a viable product alternative for the introduction of functional ingredients such as probiotics.

Keywords: Pepper fermentation. Probiotic. *Lactobacillus plantarum*. Storage.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização físico-química e centesimal da pimenta de cheiro (<i>Capsicum chinense</i>) <i>in natura</i> madura e verde em base úmida.	40
Tabela 2 – Contagem de mesófilos aeróbios na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde (PV) e madura (PM), respectivamente, sem e com tratamento térmico (TT) a diferentes temperaturas.	46
Tabela 3 – Contagem de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde (PV) e madura (PM), respectivamente, sem e com tratamento térmico (TT) a diferentes temperaturas.	46
Tabela 4 – Contagens de micro-organismos em diferentes lotes de pimenta pós-pasteurização.	47
Tabela 5 – Contagem de mesófilos aeróbios na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro com três concentrações diferentes de sal.	48
Tabela 6 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por <i>L. plantarum</i> R1012 em três diferentes concentrações de glicose a 4% NaCl.	52
Tabela 7 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por <i>L. plantarum</i> R1012 em três diferentes concentrações de sal a 0,5% de glicose.	54
Tabela 8 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por <i>L. plantarum</i> R1012.	56
Tabela 9 – Variação de fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação da pimenta de cheiro por <i>L. plantarum</i> R1012.	58
Tabela 10 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na pimenta de cheiro fermentada por <i>L. plantarum</i> R1012 durante o armazenamento sob refrigeração a 4°C.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos de pimenta de cheiro (<i>C. Chinense</i>) no estádio de maturação fisiológica verde e madura.	27
Figura 2 – Fluxograma do processo de fermentação lática da pimenta de cheiro.	32
Figura 3 – Ensaios fermentativos da pimenta de cheiro (<i>Capsicum chinense</i>) a diferentes temperaturas.	33
Figura 4 – Ensaios fermentativos da pimenta de cheiro (<i>Capsicum chinense</i>).	34
Figura 5 – Ensaios fermentativos espontâneos da pimenta de cheiro (<i>Capsicum chinense</i>).	35
Figura 6 – Fluxograma de obtenção do inoculo de <i>Lactobacillus plantarum</i> para a fermentação.	36
Figura 7 – Ensaios fermentativos controlados da pimenta de cheiro (<i>Capsicum chinense</i>).	38
Figura 8 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro madura e verde, referente à pimenta madura (PM) e pimenta verde (PV), respectivamente, a diferentes temperaturas de incubação.	42
Figura 9 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde após tratamento térmico (TT).	43
Figura 10 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro madura após tratamento térmico (TT).	44
Figura 11 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro com três concentrações diferentes de sal.	46
Figura 12 – Variação de pH, acidez titulável, contagem de mesófilos, bactérias láticas, fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro sem branqueamento.	48
Figura 13 – Variação de pH e bactérias láticas na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por <i>L. plantarum</i> R1012 em três diferentes concentrações de glicose a 4% NaCl. (A) pH; (B) Bactérias Láticas.	49
Figura 14 – Variação de pH e bactérias láticas na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por <i>L. plantarum</i> R1012 em três diferentes concentrações de NaCl a 0,5% glicose. (A) pH; (B) Bactérias Láticas.	52
Figura 15 – Variação de pH, acidez e bactérias láticas na salmoura durante a	54

fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012.

Figura 16 – Pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) fermentada em salmoura.

55

Figura 17 – Variação de pH, acidez e bactérias láticas durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012. (A) pH e acidez; (B) Bactérias láticas.

56

Figura 18 – Variação de pH, acidez e bactérias láticas na pimenta de cheiro fermentada por *L. plantarum* R1012 durante o armazenamento sob refrigeração a 4°C. (A) pH e acidez; (B) Bactérias láticas.

58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	13
2.1.1 PROBIÓTICOS.....	14
2.2 FERMENTAÇÃO	16
2.2.1 FERMENTAÇÃO LÁTICA DOS VEGETAIS	16
2.2.2 PICLES	18
2.2.3 PICLES E/OU FERMENTAÇÃO DAS PIMENTAS	20
2.2.4 BACTÉRIAS LÁTICAS	21
2.2.4.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
2.2.5 CULTURA STARTER	23
2.3 GÊNERO <i>Capsicum</i> E SUAS CARACTERÍSTICAS	24
2.3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA PIMENTA	25
2.3.2 CARACTERÍSTICAS DA PIMENTA DE CHEIRO (<i>Capsicum Chinense</i>)	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	29
3.2 MATÉRIA-PRIMA	29
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	29
3.3.1 TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS	29
3.3.2 pH	30
3.3.3 ACIDEZ	30
3.3.4 UMIDADE	30
3.3.5 CINZAS	30
3.3.6 LIPÍDEOS	30
3.3.7 PROTEÍNAS	31
3.3.8 CARBOIDRATOS	31
3.4 FERMENTAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO.....	31
3.4.1 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO	33
3.4.2 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VEGETAL SOBRE A FERMENTAÇÃO	33
3.4.3 PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	34

3.4.4 PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO COM <i>L. plantarum</i>	36
3.4.5 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL.....	38
3.4.6 ANÁLISES DE pH, ACIDEZ E MICROBIOLÓGICAS	38
3.5 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA PIMENTA FERMENTADA COM <i>L. plantarum</i> SOB REFRIGERAÇÃO	39
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS	40
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO	40
4.2 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO.....	41
4.3 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VEGETAL SOBRE A FERMENTAÇÃO	42
4.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA PIMENTA DE CHEIRO	47
4.5 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO COM <i>L. plantarum</i>	49
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL.....	56
4.7 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA PIMENTA FERMENTADA COM <i>L. plantarum</i> SOB REFRIGERAÇÃO	58
5 DISCUSSÃO	61
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO	61
5.2 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO.....	63
5.3 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VEGETAL SOBRE A FERMENTAÇÃO	64
5.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA PIMENTA DE CHEIRO	65
5.5 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE PIMENTA DE CHEIRO COM <i>L. plantarum</i>	69
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL.....	73
5.7 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA PIMENTA FERMENTADA COM <i>L. plantarum</i> SOB REFRIGERAÇÃO	75
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

As pimentas pertencem à família Solanaceae e apresentam mais de 150 variedades, sendo todas estas derivadas de cinco espécies cultivadas *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens* (BRAGA *et al.*, 2013), e estão entre as especiarias mais consumidas no mundo (SGANZERLA *et al.*, 2014). Dentre todas estas cultivares, a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) é uma das mais utilizadas na culinária e na medicina popular brasileira. Na Bahia, além da pimenta malagueta, destaca-se o consumo da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*), que não apresenta a ardência característica das pimentas, mas apresenta um aroma pungente diferenciado que torna atrativo o seu uso na culinária. A espécie *C. chinense* é uma das variedades mais populares domesticadas do território brasileiro que inclui inúmeros tipos morfológicos, com características diferentes de cor e aroma, e podem ser de baixa ou alta pungência (SGANZERLA *et al.*, 2014).

O cultivo de pimentas do gênero *Capsicum* realizado por agricultores familiares, é uma cultura de grande importância social e econômica, e sempre foram comercializadas em mercados regionais e locais, principalmente na região Norte e Nordeste, como ingrediente da culinária dessas regiões. A crescente demanda do mercado, estimado em 80 milhões de reais ao ano, tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) um dos mais importantes do país (LOPES *et al.*, 2007).

O valor nutricional das pimentas é atribuído a sua composição em proteínas, glicídios, lipídios, minerais, vitaminas, água e fibras, que quando ingeridos em uma dieta equilibrada, são capazes de assegurar a manutenção das funções essenciais do organismo, suprindo as necessidades de produção de energia, elaboração e manutenção tecidual e equilíbrio biológico (REBOUÇAS; VALVERDE; TEIXEIRA, 2013).

De acordo com Braga *et al.* (2013) as características físico-químicas relacionadas ao sabor, odor, textura e valor nutritivo, constituem atributos de qualidade à comercialização e utilização da pimenta (fruto ou polpa) na elaboração de produtos industrializados como molhos, condimentos, conservas, etc. Além disso, os frutos da pimenteira apresentam uma ampla variedade de compostos antioxidantes, em particular, polifenóis, vitamina C, flavonóides, carotenóides (por exemplo, capsaicina), com propriedades de capturar radicais livres, reduzindo o risco de câncer e doenças crônicas degenerativas (DEEPA *et al.*, 2007),

constituindo-se um valor funcional agregado para o seu cultivo e consumo humano (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2011).

A diversidade e a pungência da pimenta, assim como, seus atributos sensoriais, composição química, ações fisiológicas correlatas e o crescimento da aceitação e preferência pelos consumidores, aumentaram o interesse na pesquisa científica relacionada com os diferentes aspectos desta cultura (DOMENICO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2015).

Nos dias atuais, a demanda por vegetais naturais ou minimamente processados tem aumentado e ao mesmo tempo, têm-se aumentado a frequência com que estes produtos estão envolvidos em surtos de toxinfeções alimentares. Dentre os processos de conservação dos alimentos, destaca-se o processo de fermentação lática dos vegetais, que melhoram as condições de inocuidade, além de conferirem características nutricionais, funcionais (probióticas) e sensoriais (DI CAGNO *et al.*, 2009). A utilização de culturas iniciadoras e a agregação à concentração de sal e temperatura garantem o controle do processo (SAVARD, 2010).

A adição de bactéria lática como cultura iniciadora tem sido bastante estudada e utilizada para controle e otimização do processo de fermentação dos vegetais, a fim de reduzir em até 50% o tempo total da fermentação e as variações no desenvolvimento do processo (GOLDONI; GOLDONI, 2001; ALBERTO; PERERA; ARENA, 2013). A maioria dessas bactérias utilizadas em vários alimentos fermentados apresenta potencial a serem probióticas (XIONG *et al.*, 2014).

A demanda de produtos fermentados tem aumentado nos últimos anos, pois os consumidores que buscam informações relacionadas a esses produtos, já reconhecem que a fermentação desempenha um papel importante e benéfico à nutrição humana, a saúde e a segurança alimentar (ALBERTO; PERERA; ARENA, 2013). No entanto, verificam-se poucos produtos vegetais fermentados com essas características no mercado como picles de pepino, chucrute e azeitonas.

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar o processo de fermentação lática da pimenta de cheiro (*C. chinense*) com *Lactobacillus plantarum* isolado de um produto probiótico, para produção de picles, permitindo a possibilidade de desenvolvimento de novos produtos. Os objetos específicos compreendem analisar as características físico-químicas e a composição centesimal da pimenta *in natura*; estudar o processo de fermentação lática espontâneo e o controlado, através das análises físico-químicas e microbiológicas; e realizar a avaliação da vida de prateleira do produto armazenado sob refrigeração a 4°C.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O mercado de alimentos funcionais é crescente no mundo, e novos produtos são lançados continuamente (SIEGRIST *et al.*, 2015). A popularização das informações acerca desses produtos tem despertado o interesse dos consumidores que, cada vez mais, estão preocupados com a qualidade de vida e saúde; da indústria, que busca oferecer produtos com apelo funcional e saudável; e, sobretudo da pesquisa, devido aos avanços e as mudanças na regulamentação dos alimentos e ingredientes e a possibilidade de novas propriedades (GARCIA, 2011).

A origem do termo “alimentos funcionais” em meados da década de 80 pelo governo do Japão surgiu como resultado de esforços para o desenvolvimento de alimentos que possibilitessem a redução dos gastos com saúde pública, considerando-se a elevada expectativa de vida naquele país e a baixa incidência de doenças em alguns povos, pela sua dieta (ANJO, 2004; COSTA; ROSA, 2010). Os esquimós, com sua alimentação baseada em peixes e produtos do mar (ricos em ômega 3 e 6), por exemplo, têm baixo índice de problemas cardíacos, assim como os franceses consumidores de vinho tinto. Os orientais, devido ao consumo de soja (rico em fitoestrogênios), têm pouca incidência de câncer de mama. Dados comprovam que nesses países, o costume de consumir frutas e verduras também resulta em uma redução do risco de doenças coronarianas e de câncer (ANJO, 2004).

A portaria nº 398 (1999) da ANVISA/MS (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define alimento funcional como “todo alimento que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

O aumento da expectativa de vida e o aumento dos custos dos cuidados de saúde são fatores que contribuem para o futuro crescimento neste segmento de produto (SIEGRIST *et al.*, 2015). Esses alimentos podem variar de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos e alimentos geneticamente construídos até alimentos processados e derivados de plantas (ANJO, 2004).

Os alimentos e os ingredientes funcionais podem ser classificados quanto a sua origem (vegetal ou animal), ou quanto aos benefícios que oferecem ao organismo segundo área de

atuação (sistema gastrointestinal; sistema cardiovascular; metabolismo de substratos; crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular; funções fisiológicas e como antioxidantes) (MORAES; COLLA, 2006).

Os alimentos funcionais podem conter um ou uma combinação de componentes que conferem efeitos fisiológicos desejáveis ao organismo humano (GARCIA, 2011), tais componentes são as substâncias biologicamente ativas, como por exemplo, fitoquímicos, terpenóides, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, ácidos graxos, fibras alimentares, os micro-organismos probióticos e os prebióticos (ANJO, 2004).

Em um novo paradigma, sabe-se que com a diminuição da ingestão de compostos biologicamente ativos provenientes de vegetais, maior será o risco de adquirir as doenças crônicas não transmissíveis, contribuindo na mesma magnitude no consumo excessivo de energia e de gorduras totais e saturadas na dieta. Isso indica que os compostos bioativos, da mesma forma que os demais nutrientes, são essenciais para que se atinja a carga completa (geneticamente determinada) de longevidade (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2010).

Dentre o grupo de substâncias que possuem efeitos fisiológicos benéficos a saúde destaca-se os antioxidantes naturais, que está presente em abundância na pimenta *Capsicum*, sendo descrita como um alimento funcional. Além de ser um fruto com propriedades antiinflamatória, antimutagênica e quimiopreventiva devido à presença da capsaicina (PINTO; PINTO; DONZELES, 2013) no cultivar de frutos picantes.

Sabe-se que as pimentas têm altos teores vitamínicos e são fontes de antioxidantes naturais como a vitamina C, os carotenoides (que têm atividade pró-vitamina A), a vitamina E, as vitaminas do complexo B, e os compostos fenólicos (PINTO; PINTO; DONZELES, 2013), cujos níveis desses compostos podem variar de acordo com o estádio de maturação, a espécie e o genótipo das pimentas. Apesar da pimenta já ser considerada como alimento funcional, esta característica pode ser agregada a partir da fermentação lática, principalmente, quando esta é iniciada por bactérias probióticas.

2.1.1 PROBIÓTICOS

A *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization* (FAO/WHO, 2002) elaborou uma definição que é aceita internacionalmente, onde os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro.

A fim de exercer benefícios à saúde do hospedeiro, os probióticos devem ser capazes de crescer no intestino humano, e, portanto, devem possuir a capacidade para sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal, que envolve a exposição ao ácido clorídrico no estômago e biliar no intestino delgado (KEARNEY *et al.*, 2008).

As principais bactérias consideradas probióticas são as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ambos habitantes do trato gastrointestinal. As primeiras são habitantes normais do intestino delgado humano onde combatem patógenos, tais como *Salmonella ssp.* e *Bifidobacterium sp.*, são habitantes do intestino grosso humano, onde possibilitam a inibição do crescimento de outros micro-organismos como, *Escherichia coli* e *Candida ssp.* (AWAISHEH; HADDADIN; ROBINSON, 2005; KEARNEY *et al.*, 2008; GALLINA *et al.*, 2012). Estas espécies probióticas são micro-organismos benéficos e podem contribuir para a digestão, a estimulação imunitária, e a inibição de agentes patogênicos (KEARNEY *et al.*, 2008).

Um desafio importante associado com a aplicação de culturas probióticas no desenvolvimento de alimentos funcionais, é a retenção da viabilidade durante o processamento e a eficácia do produto, antes e após o consumo. A manutenção da viabilidade (nímeros mínimos de culturas probióticas presentes no produto final é recomendado para ser de 10^7 unidades formadoras de colônias [UFC] por mililitro ou mesmo superior) e a atividade das culturas probióticas em alimentos para o fim da vida de prateleira são dois importantes critérios que devem ser cumpridas a fim de fornecer produtos alimentares probióticos eficazes, além de que o produto deve ter um gosto aceitável durante o armazenamento (KEARNEY *et al.*, 2008). De acordo com a legislação brasileira sobre alimentos funcionais (BRASIL, 1999), a quantidade mínima viável para os probióticos, deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias [UFC] por mililitro na recomendação diária do produto pronto para o consumo.

Tradicionalmente, as culturas probióticas têm sido adicionadas a iogurtes e outros produtos lácteos fermentados, no entanto, nos últimos anos, a demanda por alimentos probióticos não lácteos tem aumentado no mercado (GUPTA; ABU-GHANNAM; SCANNELL, 2011). A introdução destes micro-organismos em produtos não lácteos como a fermentação da pimenta de cheiro, permite o seu consumo por pessoas intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite, hipercolesterolêmicas, que não podem ingerir produtos lácteos por razões particulares ou quando estes produtos são inacessíveis (PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011). Assim sendo, os vegetais oferecem uma boa alternativa

para a produção de alimentos probióticos, devido à sua ampla distribuição e o seu valor nutritivo (GUPTA; ABU-GHANNAM; SCANNELL, 2011).

2.2 FERMENTAÇÃO

A fermentação dos alimentos, após o processo de secagem, é o método de conservação dos alimentos mais antigo, tornando-se popular com o ínicio da civilização, pois além de atuar preservando os alimentos, melhorava as suas propriedades sensoriais. Com o passar do tempo, as pessoas perceberam o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos e das bebidas fermentadas, e isso fez do alimento fermentado ainda mais popular (PRAJAPATI; NAIR, 2008).

A fermentação é um processo de degradação de substâncias orgânicas realizada por micro-organismos ou por enzimas de origem vegetal ou animal (KOH, 2005). As enzimas microbianas atuam catabolizando carboidratos, gorduras, proteínas e outros componentes, que ajudam a melhorar as propriedades sensoriais e nutritivas, aumentam a digestibilidade e a vida de prateleira do produto (MACEDO; MACEDO; FLEURI, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2011).

2.2.1 FERMENTAÇÃO LÁTICA DOS VEGETAIS

A fermentação lática dos vegetais, como método de bio-preservação tradicional para a fabricação de alimentos acabados e semi-acabados, é uma biotecnologia importante para manter e/ou melhorar as propriedades de segurança, nutricionais, sensoriais e vida de prateleira dos vegetais, pois durante o processamento dos alimentos pelos métodos tradicionais de conservação como, por exemplo, aquecimento, desidratação, congelamento e a adição de conservantes, certos componentes podem degradar-se prejudicando a nutrição e as propriedades nutricionais (DI CAGNO *et al.*, 2009). Neste processo, os compostos bioativos presente nas plantas e nos alimentos são obtidos na forma de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos na fase de crescimento celular e geralmente iniciados pelo esgotamento dos nutrientes essenciais no meio como o carbono, nitrogênio ou fosfato (MARTINS *et al.*, 2011).

O valor nutritivo dos alimentos fermentados é muito pouco alterado e compara-se aos demais métodos de preservação. Essas pequenas mudanças ocorrem nos valores energéticos, minerais e vitaminas. Em muitas circunstâncias, os níveis nutricionais são aumentados devido à presença de leveduras fornecendo muitas das qualidades nutritivas das hortaliças frescas. As

características de sabor, aroma e textura das hortaliças fermentadas, dependem não apenas da sua própria natureza, como também das mudanças resultantes da atividade das enzimas microbianas e as próprias do alimento, e das interações que ocorrem durante a fermentação e a subsequente cura e envelhecimento (GOLDONI; GOLDONI, 2001).

A fermentação de frutas e vegetais pode ser desenvolvida espontaneamente pela microflora nativa ou após a inoculação de bactérias láticas (ALBERTO; PERERA; ARENA, 2013). Normalmente, as fermentações de vegetais dependem do crescimento espontâneo de bactérias láticas que correspondem a uma pequena parte da microbiota autóctone e de alguns determinantes que incluem temperatura, pH, nutrientes e concentração de sal (NaCl) na salmoura (REINA *et al.*, 2015).

Três grupos de micro-organismos são encontrados no meio em fermentação e o mais importante é o grupo das bactérias láticas e dentro do mesmo, determinadas espécies são responsáveis pela maior produção de ácido lático e pelas características do produto. Os demais grupos (enterobactérias e leveduras) são indesejáveis, pois o seu crescimento se dá em detrimento às bactérias láticas (GOLDONI; GOLDONI, 2001).

Quando ocorrem espontaneamente, a fermentação de vegetais e frutas é frequentemente caracterizada pela sucessão de bactérias ácido láticas hetero e homofermentativa, juntamente ou não com leveduras, que são responsáveis pelo processo de fermentação em várias etapas. No entanto, em alguns casos, a fermentação lática espontânea é um método inseguro e pode resultar em variações indesejáveis nas propriedades sensoriais dos produtos hortícolas frescos (DI CAGNO *et al.*, 2009). Para limitar esse risco e a estabilidade microbiológica, a utilização de culturas iniciadoras mistas são indicadas na fermentação vegetal também.

A fermentação lática tem alto impacto industrial para produção de picles (pepino), azeitonas verdes (método da salmoura), e chucrute (método da salga seca), sendo os mais importantes de origem vegetal. Outros vegetais fermentados, tais como pimentas, couve-flor e tomates verdes, também são produzidos, mas estes não são tão populares, pelo menos no Ocidente (HUTKINS, 2006).

As adições de sal (cloreto de sódio) servem para lixivar o conteúdo celular dos vegetais para a salmoura, onde será utilizado pelos microrganismos durante a fermentação, dificultando a multiplicação de microrganismos deteriorantes, além de contribuir para a melhoria da consistência do produto impedindo amaciamento dos tecidos (GOLDONI; GOLDONI, 2001). A depender do tipo de produto fabricado, a concentração de cloreto de sódio (NaCl) utilizada nas fermentações pode variar de 2% a 10% ou mais (REINA *et al.*,

2015). Entretanto, a alta concentração de sal inibe a produção de ácido lático ao criar condições desfavoráveis para o desenvolvimento de bactérias láticas durante a fermentação, interferindo na redução de pH (LIMA *et al.*, 2006; CARBONERA; SANTO, 2010).

De acordo com Goldoni e Goldoni (2001), o processo fermentativo de vegetal empregando o método da salmoura e da salga seca, podem ser conduzidos em recipientes de madeira, tanques de alvenaria ou em aço inoxidável, e ainda em recipientes plásticos. Quanto à temperatura de fermentação não é recomendável exceder a 25°C, no entanto, o processo fermentativo se desenvolve melhor entre 18°C a 20°C. As condições anaeróbicas impedem o crescimento de leveduras oxidativas tolerantes ao sal, que podem prejudicar o processo fermentativo. O final do processo pode ser verificado por controle visual e controle físico-químico (pH e acidez total expressa em % de ácido lático).

2.2.2 PICLES

Os produtos vegetais apresentados na forma de picles, feitos em domicílios ou em pequenas fábricas, são muito populares no Egito, há séculos. No Egito, os picles vegetais incluem cenouras, pepinos, nabos, couve-flor, azeitonas verdes e pretas, cebolas e pimentas. Estes produtos são usados como aperitivos e servido praticamente com cada refeição. O pepino é o vegetal mais frequentemente associado como picles, além de ser utilizado como um vegetal fresco (HUTKINS, 2006; PRAJAPATI; NAIR, 2008).

O consumo de picles e de outros vegetais fermentados no Brasil é pequeno, limitando-se a fabricação caseira e pequenas produções industriais em regiões de influência europeia. A maioria das preparações de picles na indústria utiliza-se do método em que nenhum tipo de fermentação se desenvolve, sendo obtidos pela imersão de hortaliças em vinagre condimentado, tendo como tratamento preliminar somente branqueamento. No entanto, o picles fermentado possui sabor agradável, qualidade superior ao encontrado no mercado (GOLDONI; GOLDONI, 2001) e maior vida de prateleira.

Segundo Lima (2006) picles são legumes, hortaliças e frutas conservadas em salmoura ou em vinagre com ou sem fermentação lática, com ou sem adição de açúcar ou especiarias. Os picles fermentados são produzidos em salmoura de concentração constante, na qual se desenvolvem as bactérias láticas que, pelo consumo dos açúcares próprios dos vegetais, dão formação ao ácido lático. À ação conjugada do ácido láctico formado e do sal adicionado, atua na conservação do produto, inibindo a atividade microbiana. Nos picles não fermentados,

a salmoura apresenta alta concentração de sal, que impede todo e qualquer desenvolvimento fermentativo (LETRA *et al.*, 2007).

O processo de acidificação de vegetais apresenta a vantagem de impedir a contaminação microbiana devido à diminuição do pH, pois muitos micro-organismos patogênicos como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* ocorrem naturalmente no solo e podem contaminar os vegetais, além dos micro-organismos enteropatogênicos, como a *Escherichia coli*, que contaminam os vegetais via adubo orgânico. Essa prevenção de ataque microbiano é intensificada pela utilização de esterilização. Outras características deste processo envolvem o aumento de vida útil desses vegetais e a melhoria das propriedades sensoriais, pois as bactérias láticas durante a obtenção dos picles fermentados produzem ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e outros compostos orgânicos que conferem características sensoriais peculiares a este produto (LIMA *et al.*, 2006).

Para elaboração de picles fermentados é favorável à utilização de culturas de bactérias láticas, conhecida como cultura iniciadora, para a obtenção de uma fermentação controlada (HUTKINS, 2006), devido à preocupação com segurança alimentar e a qualidade do produto. Antes desta fermentação os vegetais devem ser branqueados e o número de micro-organismos deteriorantes presentes é reduzido e/ou eliminado, o que permite a utilização de uma menor concentração de sal, assim o probiótico inoculado poderá ser consumido junto com o produto (GOLDONI; GOLDONI, 2001).

A adição de culturas iniciadoras puras contendo *L. plantarum* e *L. brevis* e espécies relacionadas tornaram-se comum para as chamadas fermentações de “picles controlados”, já que a maioria dos produtos fermentados é elaborada a partir da microbiota natural da matéria-prima que é essencial para iniciar e executar a fermentação. Os *L. plantarum* além de ser encontrado em material de planta ou em picles de salmoura, também parece ser um habitat normal do trato intestinal humano (KOH, 2005; HUTKINS, 2006).

O processo fermentativo espontâneo para produção de picles não apresenta uniformidade nos produtos, demanda maior tempo de fermentação e as altas concentrações de sal, de acordo com Hutkins (2006) impedem estes picles de serem consumidos diretamente, sendo necessário passarem por um processo de transferência de água para que a concentração de sal seja reduzida para cerca de 4%. Sendo assim, o picles fermentado de pimenta de cheiro por bactérias probióticas é uma alternativa de alta qualidade para o consumo direto desses produtos.

2.2.3 PICLES E/OU FERMENTAÇÃO DAS PIMENTAS

Os picles (não fermentados) e os produtos obtidos pela fermentação são os métodos de conservação mais utilizados para prolongar a vida de prateleira das pimentas (JARAMILLO-FLORES *et al.*, 2010). A pimenta jalapeño (*Capsicum annuum* L.) é uma das espécies mais largamente comercializadas na obtenção destes produtos (GONZÁLES-QUIJANO *et al.*, 2014), principalmente, em seu estádio verde, além de ser a mais estudada. A pimenta jalapeño é um vegetal de coloração verde a verde escuro quando imatura e vermelha quando maduro. Além da água, os componentes mais importantes da pimenta jalapeño são 1,2% de proteína, 5,3% de carboidratos, 2,3% de fibra e 0,1% de gordura. O aumento do consumo de suas fatias tem contribuído para aumentar à sua produção por fermentação e na forma de conserva (picles) nas pequenas e médias indústrias (DORANTES-ALVAREZ *et al.*, 2011).

Poucas são as informações disponíveis sobre a fermentação das pimentas. É um processo complexo e dinâmico, dependente de vários fatores. Os fatores intrínsecos ao material da planta incluem a presença de enzimas e carboidratos disponíveis. Os fatores extrínsecos tais como temperatura, pH, concentração de sal, exposição ao ar e contaminação microbiana são também importantes no processo de fermentação (FLORES; VANLEEUWEN; PENNOCK, 2007).

A preparação do picles de pimenta geralmente envolve a imersão das pimentas frescas em uma solução de cloreto de sódio e ácido acético (vinagre), durante 6 ou mais semanas à temperatura ambiente para o processo de cura. Na fermentação da pimenta, o vegetal é imerso em salmoura e o processo pode ser desenvolvido espontaneamente pela microflora nativa ou após a inoculação de bactérias láticas. Em muitos casos, a fermentação é conduzida naturalmente (GONZÁLEZ-QUIJANO *et al.*, 2014). Durante os processos, a pimenta é parcialmente desidratada e os solutos da conserva penetram no tecido da pimenta que impedem o crescimento microbiano, devido a diminuição do pH, e proporcionam as propriedades físico-químicas e sensoriais características de um produto em conserva (MÚJICA-PAZ *et al.*, 2006; VALDEZ-FRAGOSO *et al.*, 2007). No final, as pimentas originalmente verde brilhante, se tornam verde oliva (KOH, 2005). A pimenta em conserva ou fermentada é elaborada com ou sem sementes, inteiras ou cortadas longitudinalmente ou em anéis (JARAMILLO-FLORES *et al.*, 2010).

Um dos fatores que limita a utilização das pimentas em aplicação industrial é o seu forte sabor picante, que é atribuído aos capsaicinóides. Portanto, cultivares de pimentas com uma redução efetiva na pungência é importante e benéfico para ampliar a sua utilização (CHO

et al., 2015). Sendo assim, a pimenta de cheiro (*C. chinense*) por ser um cultivar com baixa pungência é uma boa alternativa para ser utilizada na elaboração de conservas ou produtos fermentados.

2.2.4 BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias láticas são gram-positivas, não esporuladas, e quase todas não apresentam motilidade e nem catalase. São bactérias que produzem ácido lático como o principal produto da fermentação de carboidratos, crescem em condições anaeróbias, e são tradicionalmente aplicadas na conservação de uma variedade de produtos alimentares fermentados (DE VRIES *et al.*, 2006). Estas bactérias produzem agentes antimicrobianos tais como ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que tem um grande potencial como conservantes de alimentos (LIU *et al.*, 2015) e cumprem um papel essencial na garantia, inocuidade e extensão da vida de prateleira desses produtos, além de serem as responsáveis pelas fermentações da maioria dos produtos vegetais. O aumento da demanda do consumo de produtos naturais e isentos de aditivos químicos tem despertado grande interesse no uso desses micro-organismos como conservantes (GOLDONI; GOLDONI, 2001).

Nas fermentações vegetais, vários gêneros de bactérias láticas estão geralmente envolvidos, incluindo espécies heterofermentativas e homofermentativas, como as espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Tetragenococcus*. Dada a diversidade dos micro-organismos inicialmente presente na matéria-prima, como as bactérias láticas e as não láticas, é necessário estabelecer a seletividade do ambiente para o sucesso da fermentação. Os fatores de seletividade são os teores de açúcares, a concentração do sal, o controle da temperatura e microaerofilia. Assim, em condições adequadas, as bactérias não láticas crescem lentamente, e em contraste, as bactérias láticas geralmente pouco afetadas, crescem e produzem ácidos que diminuem o pH, evitando o crescimento de micro-organismos concorrentes (HUTKINS, 2006)

O gênero *Lactobacillus* é muito diverso e inclui mais de 221 espécies e 29 subespécies. São micro-organismos gram-positivos, não esporulados e possuem várias características fermentativas a depender da espécie. Podem ser obrigatoriamente homofermentativas, obrigatoriamente heterofermentativas, e heterofermentativas facultativas (BURITI; SAAD, 2007). Apesar da maioria das espécies serem mesófilos, o gênero contém espécies psicrotróficos, termodúricos, ou termófilos. A temperatura ótima de crescimento

varia entre 30 a 45°C. A maioria são aerotolerantes, e os outros exigem mais condições anaeróbicas restritas (HUTKINS, 2006).

Várias espécies de *Lactobacillus* são relevantes em alimentos fermentados como, por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. caret*, *L. pentoaceticus*, *L. brevis* e *L. thermophilus*. Alguns são adicionados diretamente sob a forma de culturas iniciadoras ou estão presente na matéria-prima. Muitas espécies apresentam alta tolerância ao sal, a pressão osmótica, e a baixa atividade de água (KOH, 2005; HUTKINS, 2006).

Durante a fermentação os *Lactobacillus plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus* produzem aroma, sabor e cor do alimento que são desejáveis ao processo e inibem bactérias patogênicas e deteriorantes. Algumas dessas culturas são caracterizadas como probióticas, com efeitos benéficos à saúde e o bem estar do hospedeiro, atuando no controle e estabilização do trato intestinal, auxiliando a digestão, aumentando a absorção de minerais, entre outros (MORAES *et al.*, 2012).

Muitas das pimentas fermentadas ainda são preparadas por fermentações espontâneas, e uma sucessão de micro-organismos é identificada, tais como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Leuconostoc citreum*, e *Weissella cibaria* (GONZÁLEZ-QUIJANO *et al.*, 2014).

2.2.4.1 *Lactobacillus plantarum*

Os *Lactobacillus plantarum* é uma espécie versátil de bactérias lácticas, capazes de fermentar leite, vegetais, café, carnes e silagem, e é encontrado especialmente quando a matéria-prima é a base de plantas, geralmente são homofermentativos e convertem mais de 80% dos açúcares fermentecíveis à lactato. É largamente utilizado como cultura iniciadora ou um adjuvante para a produção de alimentos fermentados, contribuindo para a conservação, o aroma e a textura, além de ser aplicado em ambientes industriais devido à sua versatilidade e capacidade metabólica. É um micro-organismo que pode ser encontrado em numerosos nichos ecológicos, incluindo o trato gastrointestinal de seres humanos e animais, por apresentar ampla diversidade fenotípica e estirpes com diferentes capacidades metabólicas para ser utilizada em muitos processos industriais (FELTRIN *et al.*, 2000; DE VRIES *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2015; FERRANDO *et al.*, 2016).

São bactérias de bacilos curtos, imóveis, gram-positivos, ausência de catalase e anaeróbicos facultativos, e são os mais importantes na fermentação vegetal. Sua temperatura ótima para formação de ácido láctico varia entre 18 e 20°C. O pH ótimo para crescimento do *L.*

plantarum é de 4,5 a 5,5. Este micro-organismo é bem resistente à concentração de sal até 12%, o que desfavorece o crescimento de bactérias patogênicas e/ou putrefativas (HUTKINS, 2006). Algumas destas cepas são considerados potenciais probióticos (FERRANDO *et al.*, 2016), pois promovem a digestão e a absorção, mantêm o equilíbrio da flora intestinal e aumentam a imunidade humana (LIU *et al.*, 2015), já que predominam nas fermentações espontâneas láticas dos alimentos, onde o pH é geralmente inferior a 4,0 (MOLIN, 2008).

Espécies de *L. plantarum* mantém a viabilidade após a sua passagem através do trato gastrointestinal em seres humanos e outros mamíferos, sobrevivendo às condições ácidas do estômago, e algumas estirpes poderia proporcionar diversas propriedades terapêuticas para o hospedeiro (FERRANDO *et al.*, 2015).

Várias propriedades curativas ou preventivas têm sido associados com *L. plantarum*, como a redução significativa da concentração de colesterol e fibrinogênio, e também a redução do risco de doença cardiovascular e, portanto, inibe a aterosclerose em fumantes. Além disso, atua na redução da incidência de diarréia em crianças, redução da dor e constipação associada à síndrome do intestino irritável, inchaço reduzido, flatulência, capacidade para deslocar enteropatógenos a partir de células Caco-2, e capacidade de exercer efeito positivo sobre a imunidade em crianças HIV⁺. *L. plantarum* tem um dos maiores genomas conhecidos entre as bactérias ácido láticas, e é uma espécie muito flexível e versátil (ZAGO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2015).

2.2.5 CULTURA STARTER

A fermentação natural para ser bem sucedida não requer apenas que os micro-organismos “corretos” estejam presentes, mas também são estabelecidas condições adequadas para o seu crescimento. Mesmo se estes requisitos estão preenchidos, no entanto, não há garantia de que o produto vai atender às expectativas de qualidade, ser seguro para o consumo, ou mesmo ser produzido com sucesso. Mas, muitos alimentos são produzidos por fermentações naturais como, por exemplo, as azeitonas, os vinhos, picles e outros vegetais fermentados. Uma outra forma de produzir alimentos fermentados é através da utilização de uma cultura inicial contendo o micro-organismo relevante para esse produto específico (HUTKINS, 2006) a fim de reduzir o tempo de fermentação.

As culturas starters (ou iniciadoras) são culturas puras de micro-organismos ativos ou latentes que são inoculados diretamente nos alimentos para sobrepor a microbiota já existente, a fim de realizar as mudanças desejadas no produto final. Estas alterações podem

incluir nova funcionalidade, aumento da preservação pela inibição de micro-organismos deteriorantes, redução dos riscos de segurança alimentar através do controle de patógenos pela competição entre eles, melhoria nutricional ou o valor da saúde através de efeitos positivos na microbiota intestinal, maiores qualidades sensoriais, e aumento do valor econômico (HUTKINS, 2006; BERNARDI; GOLINELI; CONTRERAS-CASTILLO, 2010).

2.3 GÊNERO *Capsicum* E SUAS CARACTERÍSTICAS

As pimentas são vegetais pertencentes à família das Solanaceas e ao gênero *Capsicum*, assim denominadas para diferenciá-las da pimenta do reino (*P. nigrum* L.), da pimenta rosa (*Schinus molle* L.) e da pimenta da jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl.). Apesar de todas elas, serem chamadas de pimentas e utilizadas como condimentos, não possuem parentesco entre si e cada qual apresentam propriedades químicas diferentes (DOMENICO, 2011). O centro de origem do gênero *Capsicum* é a América, sendo o México país que possui a maior diversidade genética e o maior consumidor de pimentas no mundo (JARAMILLO-FLORES *et al.*, 2010).

O nome do gênero *Capsicum* deriva do grego: Kapso (picar) ou Kapsakes (cápsulas) e a palavra pimenta aparece na língua castelhana no século XIII, derivada do latim *pigmenta*, plural de *pigmentum*, corante (DOMENICO, 2011 *apud* NUEZ *et al.*, 1996). As espécies de pimentas (*Capsicum*) pertencem à família Solanaceae, como o tomate, a batata, a berinjela e o jiló. Deste gênero, 30 espécies foram classificadas e identificadas, mas, apenas cinco das espécies são domesticadas e largamente cultivadas e utilizadas pelo homem: *C. annuum* (pimentas ‘jalapeño’, ‘cayenne’, ‘americana’); *C. baccatum* (pimentas ‘dedo de moça’, ‘cambuci’, ‘chifre de veado’, ‘cumari’); *C. chinense* (pimentas ‘de cheiro’, ‘bode’, ‘cumari do pará’, ‘murici’, ‘murupi’); *C. frutescens* (pimentas ‘malagueta’, ‘tabasco’) e *C. pubescens*. Destas, somente *C. pubescens* não é cultivada no Brasil (LOPES *et al.*, 2007). Todos estes cultívares apresentam características de frutos bem definidos.

O gênero *Capsicum* pode ser associado à medicina tradicional humana e ao combate de enfermidades em criações domésticas, contudo é mais fortemente relacionado a produtos condimentares para intensificar, por exemplo, o aroma e o gosto na culinária, devido aos alcalóides (capsaicinóides) contidos em seus frutos (BARBOSA *et al.*, 2002). É uma matéria-prima que serve de corante, aromatizante e oleorresina, usado em produtos alimentícios, por conferir sabor e aumentar a estabilidade oxidativa dos lipídeos (ANTUNES *et al.*, 2012). São

utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (JARAMILLO-FLORES *et al.*, 2010).

Segundo Pinto, Pinto e Donzeles (2013) os componentes químicos das pimentas são divididos em dois grupos. O primeiro determina o uso da pimenta como condimento e compreende a capsaicina, os carotenóides, os polifenóis e vários componentes voláteis, em especial as pirazinas e os ácidos orgânicos. O segundo compreende os componentes nutricionais como carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, fibras e sais minerais. Variações dos componentes podem ocorrer de acordo com a espécie, a cultivar, as condições de cultivo e a maturação dos frutos, dentre outros.

2.3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA PIMENTA

O agronegócio de pimentas (*Capsicum spp.*) está entre os melhores exemplos de integração na cadeia produtiva de hortaliças (OHARA; PINTO, 2012). O mercado de pimenta é um segmento crescente no mundo, tanto para consumo *in natura* quanto para processamento, devido ao seu alto aproveitamento na culinária para temperos. A produção de pimenta como especiaria e como hortaliça teve aumento mundial de 21%, de 1994 a 1998 (DOMENICO *et al.*, 2012; PINTO; PINTO; DONZELES, 2013). No entanto, os dados estatísticos de produção são escassos por ser uma hortaliça comercializada em mercados regionais e locais.

O cultivo de pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil é de grande importância socioeconômica, pois contribui na geração de renda, principalmente quando o produtor agrega valor ao produto, e o cultivo é realizado por agricultores familiares que geram empregos, pois a colheita demanda certa quantidade de mão de obra (DOMENICO *et al.*, 2012).

Os principais estados produtores no Brasil são Bahia, Ceará, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Rio Grande do Sul. Além de serem consumidas frescas ou cozidas, imaturas ou maduras, as pimentas abastecem a agroindústria e podem ser processadas e utilizadas em diversas linhas de produtos como na elaboração de molhos, condimentos, conservas em ácido acético e em óleo, produtos desidratados e fermentados. Apresentam teores de vitamina A e C superiores aos encontrados no pimentão e demais olerícolas produzidas no Brasil (REBOUÇAS; VALVERDE; TEIXEIRA, 2013).

A Amazônia é um importante centro de diversidade de *Capsicum spp.* no estado brasileiro, em especial as pimentas da espécie *C. chinense* Jacq. (COSTA *et al.*, 2008). Em 2005, o segundo vegetal mais exportado do Brasil foram às pimentas do gênero, com um

volume de exportação de 9222 t (SGANZERLA *et al.*, 2014). Apesar de o gênero *Capsicum* apresentar grande importância socioeconômica, poucos estudos de caracterização direcionados ao uso e conservação desses germoplasma são existentes (COSTA *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Barbosa *et al.* (2002) sobre as pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas no Estado de Roraima, verificou-se que as pimentas denominadas como “de cheiro” (*Capsicum chinense*), que apresentam baixa a média pungência, foram as que apresentaram o maior potencial comercial entre todos os morfotipos locais. Esse tipo de pimenta também apresenta uma grande preferência de consumo no município de Teresina (PI) de acordo com Monteiro (2008).

Um grande desafio a ser superado no agronegócio da pimenta são as perdas pós-colheita, já que os mesmos na forma *in natura* são altamente perecíveis, e têm vida útil muito curta. Esta característica, aliado ao manuseio inadequado durante a colheita até a chegada do produto ao mercado geram perdas quantitativas e qualitativas que chegam às agroindústrias e ao consumidor (BERNARDO *et al.*, 2015). Uma das formas de conservação e consumo dessa hortaliça é através da fermentação lática que representa excelente forma de redução de perdas pós-colheita.

2.3.2 CARACTERÍSTICAS DA PIMENTA DE CHEIRO (*Capsicum Chinense*)

A pimenta de cheiro pertencente à família Solanaceae e ao gênero *Capsicum*, tem como centro de origem as Américas. O Brasil é reconhecido como centro secundário de espécies domesticadas de *Capsicum*, e a região Amazônica é a que concentra a maior diversidade de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) (CERQUEIRA, 2012). Segundo Moreira *et al.* (2010, p. 9) “seu nome deriva do cheiro peculiar e muito agradável e do sabor característico”, doce ou pouco picante, sendo utilizada como tempero em arroz, saladas e frutos do mar.

Os atributos nutricionais, sensoriais e promoção à saúde fazem da pimenta um dos vegetais mais consumidos em todo o mundo, e o que contribui para as características de sabor e valor nutricional durante o amadurecimento do vegetal são os açúcares livres e os ácidos orgânicos. A pimenta de cheiro apresenta em média concentrações de açúcares totais (sacarose, glicose e frutose) variando de 198 a 1543 mg/100g, a concentração de sacarose nos frutos maduros de *C. chinense* varia de 0 a 150 mg/100g (peso fresco), além de conter níveis elevados de açúcares totais, e concentrações variadas de ácidos cítrico, fumárico, málico e succínico, de acordo com o grau de maturação (JARRET *et al.*, 2009).

Além das propriedades antioxidantes, as pimentas também são fontes de vitamina C, do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, B-6 e ácido fólico) e A, e contêm fibras, elementos vitais no processo da digestão e prevenção de várias doenças (DOMENICO, 2011). Com o consumo diário, estes compostos podem prevenir várias doenças humanas, incluindo vários tipos de câncer, aterosclerose e doenças cardiovasculares (HARRIS, 1996; BRAMLEY, 2000).

As pimentas são consumidas madura ou imatura, em bruto ou em conserva ou na forma de picles. São caracterizadas pela grande variabilidade no formato, na pungência, no aroma, na coloração (verde, amarelo, laranja, vermelho e roxo) e nos tamanhos, o que favorece o uso das pimentas em vários processamentos (DI CAGNO, *et al.*, 2009; DOMENICO *et al.*, 2012). Geralmente a pimenta de cheiro é comercializada e consumida verde, e descartada quando madura.

Em um levantamento realizado por Barbosa *et al.* (2002), a espécie que apresentou a maior diversidade de forma (“alongada” ou “ovalada”) foi a *C. chinense* quando comparada com as espécies *C. frutescens*, *C. annuum* e *C. baccatum* que estavam concentradas na forma “alongada”. A *C. Chinense* também apresenta uma enorme variabilidade de tamanho e cor. Cerqueira (2012) relata que o fruto apresenta várias superfícies, do liso ao rugoso, com comprimento variando de 10 a 12,0 cm. Em relação à cor do fruto, quando imaturas, a cor do pericarpo é verde ou amarelo-limão; e quando maduros, pode variar entre vermelho e alaranjado (Figura 1).

Figura 1 – Frutos de pimenta de cheiro (*C. Chinense*) no estágio de maturação fisiológica verde e madura.



Fonte: Autora

Os componentes principais, responsáveis pelo sabor picante ou pungente característico e também pelas atividades biológicas atribuídas às pimentas, é atribuído aos alcalóides

denominados de capsaicinóides, exclusivos do gênero *Capsicum* (CERQUEIRA, 2012; DOMENICO *et al.*, 2012). O grau de picância dos frutos *C. chinense* varia da mais suave até a mais forte a depender da variedade (REIFSCHEIDER, 2000).

Dentre os 14 capsaicinóides já identificados, o componente mais importante nos frutos são a capsaicina, que responde por 71% do total, e em segundo a dihidrocapsaicina (DOMENICO *et al.*, 2012; PINTO; PINTO; DONZELES, 2013). Essas substâncias (capsaicina e dihidrocapsaicina) são encontradas em maior quantidade nos frutos e acumulam na superfície, onde as sementes se inserem (CERQUEIRA, 2012). A capsaicina, além de ser o princípio ativo que representa as propriedades organolépticas e farmacêuticas, e confere a sensação de ardor às pimentas, é a mesma que possui propriedades benéficas à saúde (DOMENICO *et al.*, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

Os experimentos deste projeto foram realizados nos Laboratórios de Biotecnologia e Controle de Qualidade de Alimentos, Laboratório de Química de Alimentos, do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), BA.

3.2 MATÉRIA-PRIMA

A pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) utilizada no experimento foi adquirida no comércio local da cidade de Feira de Santana-BA.

A matéria-prima foi selecionada em dois estádios de maturação, verde e madura, para avaliação das características físico-químicas e à composição química proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1997). Os vegetais foram lavados em água corrente, sanitizadas com hipoclorito de sódio (100ppm) e novamente lavados em água corrente, e armazenadas em temperatura ambiente antes da sua utilização.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A caracterização físico-química e centesimal da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) *in natura* constou das seguintes avaliações: teor de sólidos solúveis, pH, acidez, umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos.

Uma parte do lote dos vegetais selecionados foi extraída em centrífuga despolpadeira, onde foram avaliados o teor de sólidos solúveis totais, pH e acidez, e nos vegetais cortados na longitudinal, umidade e cinzas. À outra parte, foi seca a 60°C em estufa, até peso constante, trituradas e homogeneizadas, para análise de lipídeos e proteínas.

Todas as determinações foram realizadas com três lotes distintos em triplicata e os resultados expressos como médias e desvio padrão.

3.3.1 TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS

O teor de sólidos solúveis na amostra foi determinado por refratometria, utilizando o refratômetro portátil (LAMBDA, mod. WYT-4), previamente calibrado com água destilada e

em seguida foi transferido de 2 a 3 gotas da polpa da pimenta para o prisma do refratômetro onde se procedeu a leitura diretamente na escala em °Brix. Os resultados foram expressos em graus Brix (°Brix).

3.3.2 pH

O pH dos vegetais *in natura*, em 10 ml por amostra, foram determinados em potenciômetro portátil digital (HANNA INSTRUMENTS CALIBRATION, modelo HI 221), previamente calibrado com as soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0, introduzindo o eletródo diretamente nas amostras.

3.3.3 ACIDEZ

A acidez titulável dos vegetais *in natura*, expressa em % de ácido cítrico, foi determinada utilizando-se 5 g de amostra, por titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N usando fenolftaleína a 1% como solução indicadora.

3.3.4 UMIDADE

A determinação de umidade foi realizada utilizando-se 10 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente aquecida e pesada, onde foi transferida à estufa a 105°C, até peso constante.

3.3.5 CINZAS

O teor de cinzas nas amostras foi determinado pela combinação com a determinação direta de umidade. Cerca de 3 g do resíduo obtido na determinação de umidade, previamente incinerado e pesado, foi transferido para mufla a 550°C para total destruição da matéria orgânica, até peso constante.

3.3.6 LIPÍDEOS

O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Bligh-Dyer (1959) que compreende um método de extração de gordura a frio, utilizando uma mistura de clorofórmio, metanol e água.

3.3.7 PROTEÍNAS

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl modificado (1883), compreendendo as etapas de digestão com H_2SO_4 , destilação com solução de NaOH 40% e titulação com solução de HCl 0,1 N (IAL, 1997). Foi utilizado o fator de conversão para proteína bruta equivalente a 6,25.

3.3.8 CARBOIDRATOS

A estimativa de carboidratos foi calculada por diferença entre 100% com quantidade de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos determinados.

3.4 FERMENTAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO

As pimentas foram selecionadas quanto ao grau de maturação e tamanho, ambos através das características visuais, mas firmes e isentas de danos fisiológicos. Após sanitizados, os vegetais inteiros foram divididos em dois lotes. O primeiro foi submetido ao processo de branqueamento, colocados nos recipientes de vidro e cobertos com salmoura estéril, para serem submetidos à fermentação lática espontânea e à fermentação controlada a partir da inoculação de bactérias lácticas (*L. plantarum*) (Figura 2). O segundo não foi submetido ao processo de branqueamento para ser realizada a fermentação espontânea como tradicionalmente. A salmoura foi preparada com água mineral e cloreto de sódio (NaCl) para a fermentação espontânea com os vegetais submetidos ao processo de branqueamento, e adicionou-se glicose para as demais fermentações.

O desenvolvimento da fermentação da pimenta de cheiro foi realizado a partir da seleção da temperatura e da influência do tratamento térmico nos vegetais sobre a fermentação, ambos realizados em salmoura na mesma concentração de sal (2%).

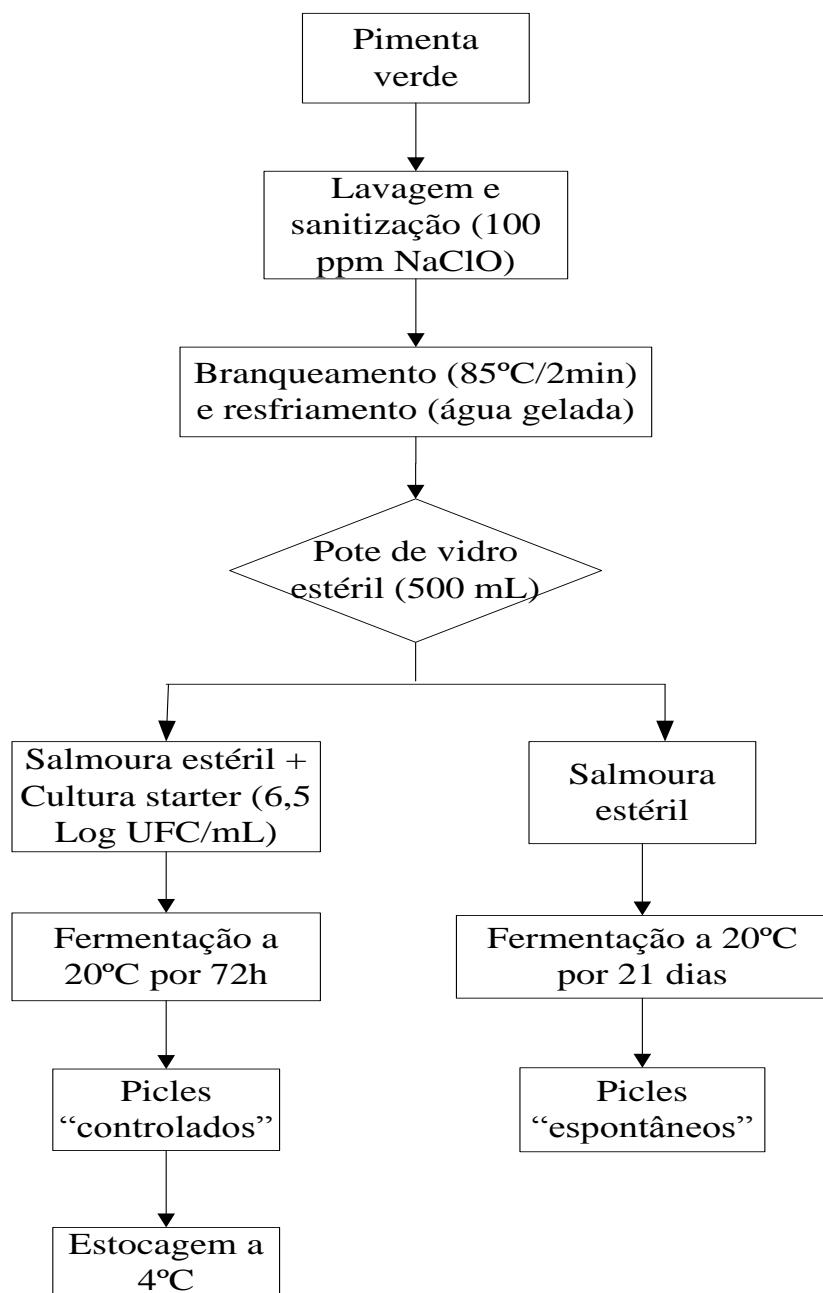
A fermentação espontânea com os vegetais submetidos ao processo de branqueamento foi realizada em triplicata a partir de três níveis de concentração de sal 2, 3 e 4% (p/v) (JOHANNINGSMEIER *et al.*, 2012) e na matéria-prima não submetida ao processo de branqueamento, a análise foi realizada a 4% de NaCl (BEGANOVIC *et al.*, 2014) e 0,5% de glicose.

A determinação da concentração de sal e glicose, para a formulação do produto final a partir da fermentação controlada com *L. plantarum*, foi realizada a partir do estudo em

triplicata variando a concentração de sal (4, 5 e 6%) e glicose (0,5, 1 e 2%), segundo os níveis atualmente utilizados (ALBERTO; PERERA; ARENA, 2013; RANDAZZO *et al.*, 2014; NILCHIAN *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2016), e análise sensorial com o objetivo de avaliar o sabor da pimenta. O produto final foi formulado a partir da análise fermentativa a 6% de NaCl, 2% de glicose e inoculo inicial a uma concentração total de células de 6,5 Log UFC/mL.

As fermentações foram repetidas em triplicata com vegetais de lotes distintos.

Figura 2 – Fluxograma do processo de fermentação lática da pimenta de cheiro.



3.4.1 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO

Para avaliação do processo fermentativo espontâneo da pimenta de cheiro *in natura* nos estádios de maturação, madura e verde, em salmoura (2% NaCl), foram testadas duas temperaturas de fermentação, 20°C e 35°C, onde procedeu-se determinação de pH através da abertura do recipiente para coleta da amostra e avaliação visual por 8 dias.

O processo de fermentação a diferentes temperaturas ocorreu em recipientes de vidro com capacidade para 500 ml, previamente esterilizados e fechados, acondicionados em câmara incubadora demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.), em escala de bancada (Figura 3).

Figura 3 – Ensaios fermentativos da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) a diferentes temperaturas.



Fonte: Autora

3.4.2 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VEGETAL SOBRE A FERMENTAÇÃO

A fim de diminuir e/ou eliminar a microbiota nativa do vegetal sem alterar as propriedades nutricionais e a textura, diferentes temperaturas de branqueamento foram testadas. A pimenta de cheiro madura e verde foi submetida ao tratamento térmico por imersão em água quente a 85°C, 90°C e 95°C por 2 minutos, seguido de imersão em água gelada por 2 minutos. Antes (Grupo controle) e após cada tratamento, a mesma foi suspensa em salmoura estéril (2% NaCl) utilizando-se a relação vegetal/salmoura de 1:10 p/v, as quais

foram submetidas à fermentação espontânea pelo processo microaerofílico a 20°C por 20 dias.

O processo de fermentação ocorreu em recipientes de vidro com capacidade para 500 ml, previamente esterilizados e fechados, adaptados para a completa imersão da pimenta na salmoura (Figura 4), acondicionados em câmara incubadora (B.O.D.).

Figura 4 – Ensaios fermentativos da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*).



Fonte: Autora

O efeito do branqueamento sobre a estabilidade microbiológica e a determinação de pH durante a fermentação foi avaliada nos intervalos de 0, 5, 10, 15 e 20 dias, em amostras de salmoura retirados do recipiente através da abertura do sistema.

3.4.3 PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Para o processo de fermentação espontânea com os vegetais submetidos ao processo de branqueamento foram realizadas três análises em triplicata que se diferenciaram pelas diferentes concentrações de NaCl (2, 3 e 4%, p/v). A eficiência do branqueamento na matéria-prima foi avaliada através da contagem microbiológica, de acordo com a metodologia descrita em Silva, Junqueira e Silveira (2010).

A pimenta verde, após branqueamento, foi submersa em salmoura em cada ensaio na proporção de 1:10 p/v entre vegetal e salmoura, onde foram acondicionados em câmara incubadora (B.O.D.) a 20°C durante 21 dias. No decorrer da fermentação, nos intervalos de 0, 7, 14 e 21 dias, foram coletadas amostras de salmoura com seringas estéreis sem necessidade

de abertura do sistema para as determinações de pH e análises microbiológicas, as determinações foram realizadas em triplicata.

Em contrapartida, a matéria-prima que não foi submetida ao processo de branqueamento foi submersa em salmoura a 4% NaCl e 0,5% glicose, na proporção de 2,6:10 p/v entre vegetal e salmoura, onde foram acondicionados em câmara incubadora (B.O.D.) a 20°C durante 19 dias. Contagens de bactérias láticas foram realizadas nas pimentas *in natura* a fim de quantificar o número inicial de bactérias naturais láticas. No decorrer da fermentação, nos intervalos de 0, 3, 5, 7, 9, 11, 15 e 19 dias, foram coletadas amostras de salmoura assepticamente como mencionada acima para as determinações de pH, acidez e análises microbiológicas. Após 19 dias, final da fermentação, amostras de vegetais foram retiradas para serem analisadas quanto à sua consistência e contagem de bactérias láticas.

As fermentações foram realizadas em recipientes fechados de 500 ml adaptados à completa imersão da pimenta em salmoura e à retirada de amostras de salmoura para as análises com a manutenção da anaerobiose do meio (Figura 5).

Os valores encontrados nas análises, assim como o controle visual do aspecto das fermentações, serviram para avaliar o final do processo fermentativo.

Figura 5 – Ensaios fermentativos espontâneos da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*).



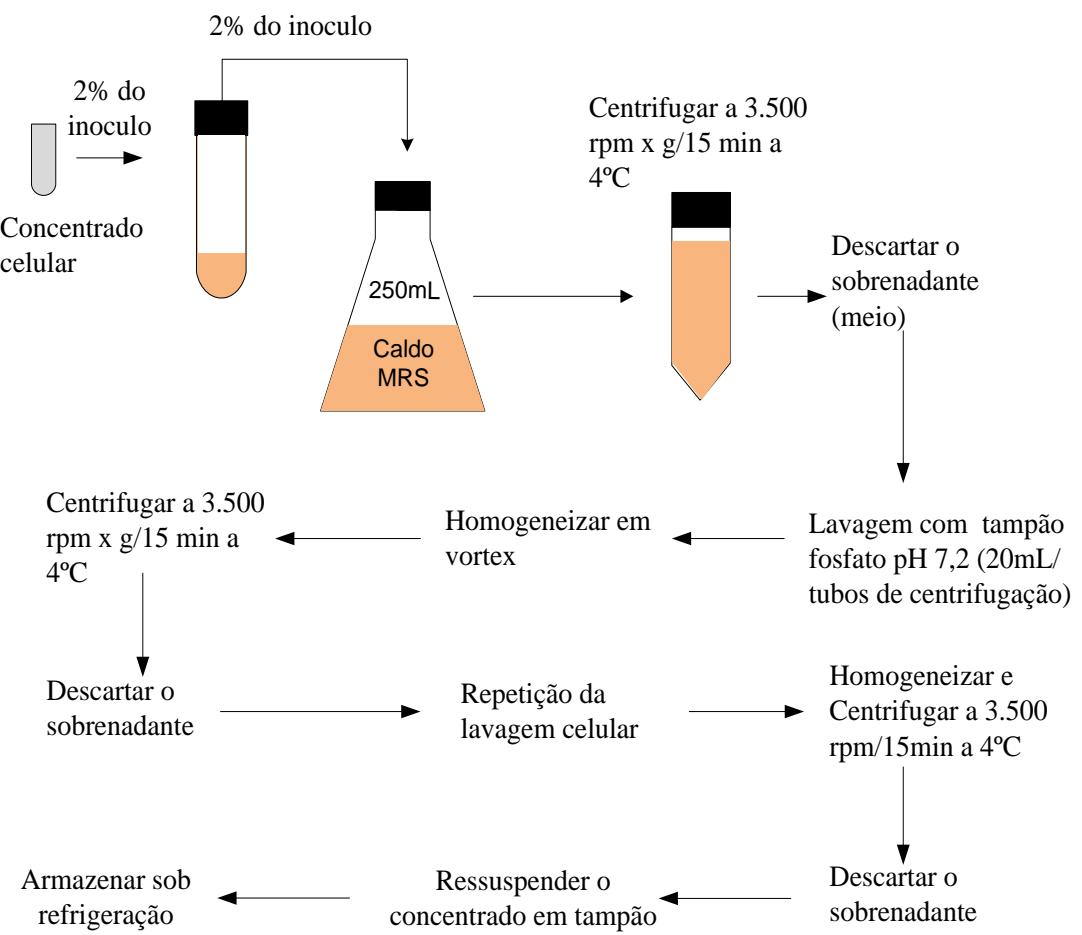
Fonte: Autora

3.4.4 PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO COM *L. plantarum*

A cepa de inoculo de *Lactobacillus plantarum* R1012 usada neste experimento foi adquirida do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Feira de Santana, isolado do produto probiótico Jarro-Dophilus, conforme Cerqueira e Teshima (2011).

O inoculo utilizado para a fermentação foi obtido a partir do concentrado celular congelado a -20°C do micro-organismo isolado, e ativado conforme metodologia de Teshima (1997), Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma de obtenção do inoculo de *Lactobacillus plantarum* para a fermentação.



Fonte: Adaptado de Teshima (1997)

A primeira ativação foi realizada inoculando 0,2 mL do concentrado celular em 10 mL de caldo MRS e incubação a 35°C por 24 a 48 h para crescimento. Após turvação do meio, o

inoculo foi novamente ativado por duas transferências sucessivas em caldo MRS de acordo o volume seguinte a 35°C por 24h. A última ativação (50 mL de caldo MRS + cultura) foi transferida para tubos de centrifugação esterilizados, obtendo o concentrado de cultura através da centrifugação destes tubos em centrífuga refrigerada a 3.500 rpm x g/15 min a 4°C e lavada duas vezes com tampão fosfato, pH 7,2, estéril para a remoção do MRS residual. Posteriormente, o concentrado foi ressuspenso na proporção de 1:10 de tampão fosfato pH 7,2 estéril, obtendo-se assim a cultura iniciadora que foi conservada em geladeira, à temperatura de refrigeração, até o momento de sua utilização.

Os ensaios fermentativos controlados em triplicata foram realizados a partir de três ensaios. Para cada ensaio foram utilizadas a mesma concentração de sal 4% (p/v), diferentes concentrações de glicose 0,5, 1 e 2% (p/v), inoculo inicial com cerca de 6,5 Log UFC/mL e 133 g de pimenta no estádio verde, previamente submetida ao processo de branqueamento, na proporção de 2,6:10 entre vegetal e salmoura, onde foram mantidos em câmara incubadora (BOD) a 20°C durante 3 dias. Em 0,5% de glicose, os experimentos foram novamente executados para o estudo do efeito da concentração de sal (5 e 6%, p/v) na fermentação da pimenta com bactérias láticas. A partir das condições ótimas obtidas, referencial teórico e testes preliminares sensoriais, o produto final foi formulado a partir da análise fermentativa a 6% de NaCl, 2% de glicose, inoculo inicial a uma concentração total de células de 6,5 Log UFC/mL e pH inicial de 6,5 ajustado com NaOH 1N. O inoculo inicial foi ativado em caldo MRS suplementado com 2% NaCl (p/v) e incubado a 20°C em B.O.D., conforme fluxograma apresentado na Figura 6.

As fermentações em triplicata foram realizadas em recipientes fechados adaptados à completa imersão da pimenta em salmoura e à retirada de amostras de salmoura para as análises com a manutenção da anaerobiose do meio, Figura 7.

No decorrer da fermentação, nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 horas, foram coletadas amostras de salmoura com seringas estéreis sem necessidade de abertura do sistema para as determinações de pH, acidez e análises microbiológicas. Após 72 horas, final da fermentação, amostras de vegetais foram retiradas para serem analisadas quanto à sua consistência, através da análise sensorial, e contagem de bactérias láticas, fungos filamentosos e bolores. Os valores encontrados nessas análises, assim como o controle visual do aspecto das fermentações, serviram para avaliar o final do processo fermentativo.

Figura 7 – Ensaios fermentativos controlados da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*).



Fonte: Autora

3.4.5 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL

Na caracterização físico-química e microbiológica do produto final fermentado, as amostras de pimenta de cheiro foram analisadas separadamente da salmoura. Para cada tempo de incubação, as fermentações foram realizadas em recipientes separados e fechados adaptados à completa imersão da pimenta em salmoura, onde foram mantidos em câmara incubadora (B.O.D.) a 20°C durante 3 dias.

Nos intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, tanto as amostras de salmoura como o vegetal fermentado, foram submetidos às determinações de pH, acidez e análises microbiológicas de bactérias láticas e, fungos filamentosos e leveduras.

3.4.6 ANÁLISES DE pH, ACIDEZ E MICROBIOLÓGICAS

As amostras de salmoura da fermentação e os vegetais fermentados foram submetidos à análise de pH (em equipamento de pH portátil, modelo HI 221, HANNA INSTRUMENTS CALIBRATION), acidez titulável (ATT) e contagem microbiológica. As análises de pH e acidez nos vegetais fermentados foi determinada utilizando-se 5 g de amostra, triturada,

diluída em 50 mL de água destilada (IAL, 1997). A acidez foi determinada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N usando fenolftaleína a 1% como solução indicadora, expressando-se o resultado em porcentagem de ácido lático (IAL, 1997). Para a contagem de micro-organismos foram utilizados os meios PCA (Plate Count Agar), BDA (Batata Dextrose Agar) acidificado com ácido tartárico a 10%, e MRS (Man Rogosa Sharp), para análise de mesófilos, fungos filamentosos e leveduras, e bactérias láticas, respectivamente, conforme Silva, Junqueira e Silveira (2010). Para as contagens foram realizadas 3 diluições em duplicita e realizada a contagem daquelas que apresentaram de 25 a 250 colônias. Para obtenção dos resultados foram calculados as médias e desvios padrão. A morfologia das culturas foi observada pela coloração de Gram e teste da catalase.

3.5 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA PIMENTA FERMENTADA COM *L. plantarum* SOB REFRIGERAÇÃO

Após o período de fermentação, 72 horas, os recipientes com as pimentas fermentadas em salmoura contendo NaCl (6%), glicose (2%) e bactérias láticas, foram acondicionadas sob refrigeração a 4°C durante 32 dias, a cada 7 dias foram retiradas amostras de salmoura e de vegetais para as mesmas determinações físico-químicas e microbiológicas realizadas no período fermentativo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste t para comparação das médias, ao nível de 5% de probabilidade cujos resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão. Os testes foram realizados no programa SISVAR[®] versão 5.6, 2003. O Origin 8 foi utilizado para elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO

Os resultados da caracterização físico-química e centesimal da pimenta de cheiro *in natura*, em estádios de maturação madura e verde, que caracterizam as potencialidades desta espécie utilizada na fermentação lática em salmoura, estão apresentados na Tabela 1. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias dos estádios de maturação ($p<0,05$) para a maioria das características do vegetal estudado, exceto na composição de cinzas, proteínas e lipídeos, e coeficientes de variação (CV) considerado altos, podendo indicar, possivelmente, grande variação entre os lotes adquiridos do vegetal dentro de um mesmo cultivar.

Tabela 1 – Caracterização físico-química e centesimal da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) *in natura* madura e verde em base úmida.

Compostos	Pimenta Madura	CV(%)	Pimenta Verde	CV(%)
pH	$5,13 \pm 0,19^*$	0,44	$5,77 \pm 0,12$	0,32
Sólidos solúveis (°Brix)	$6,00 \pm 0,00^*$	3,71	$5,00 \pm 0,00$	0,00
Acidez (ác. cítrico/100g)	$0,22 \pm 0,03^*$	0,00	$0,19 \pm 0,01$	9,11
Umidade (%)	$89,94 \pm 0,38^*$	0,52	$91,76 \pm 0,99$	1,20
Cinzas (%)	$0,62 \pm 0,03$	4,70	$0,51 \pm 0,07$	19,14
Proteínas (%)	$1,23 \pm 0,08$	7,22	$0,86 \pm 0,28$	15,69
Lipídeos (%)	$0,60 \pm 0,07$	8,13	$0,35 \pm 0,20$	11,86
Carboidratos (%)	$7,61 \pm 0,22^*$	5,18	$6,51 \pm 0,48$	13,11

*Diferença estatística significativa pelo teste t ($p<0,05$)

CV – Coeficiente de Variação

Os resultados de pH para a pimenta de cheiro madura apresentaram valores menores indicando maior acidez, quando comparados com a verde, sendo seus valores de 5,13, e 5,77, respectivamente. Os teores de sólidos solúveis variaram com o desenvolvimento do estádio de maturação da pimenta, sendo de 6 °Brix para a pimenta madura e de 5 °Brix para a pimenta verde. Em relação à acidez titulável, em ácido cítrico, observou-se o valor de 0,22%, referente ao estádio maduro e de 0,19% para o estádio verde.

Em diferentes estádios de maturação, pode-se observar que os cultivares maduros apresentou menor umidade (89,94% em média), em relação àqueles verdes (91,76%), sendo ambos constituídos principalmente de água.

Como resultado da determinação de cinzas, proteínas e lipídeos, obteve-se 0,62 e 0,51%, para cinzas, 1,23 e 0,86%, para proteínas e 0,60 e 0,35%, para lipídeos, na pimenta de cheiro madura e verde, respectivamente, mas observa-se aumento destes parâmetros na amostra madura.

Para o valor teórico de carboidratos, o teor médio na pimenta madura foi de 7,61%, e na verde, 6,51%.

4.2 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO

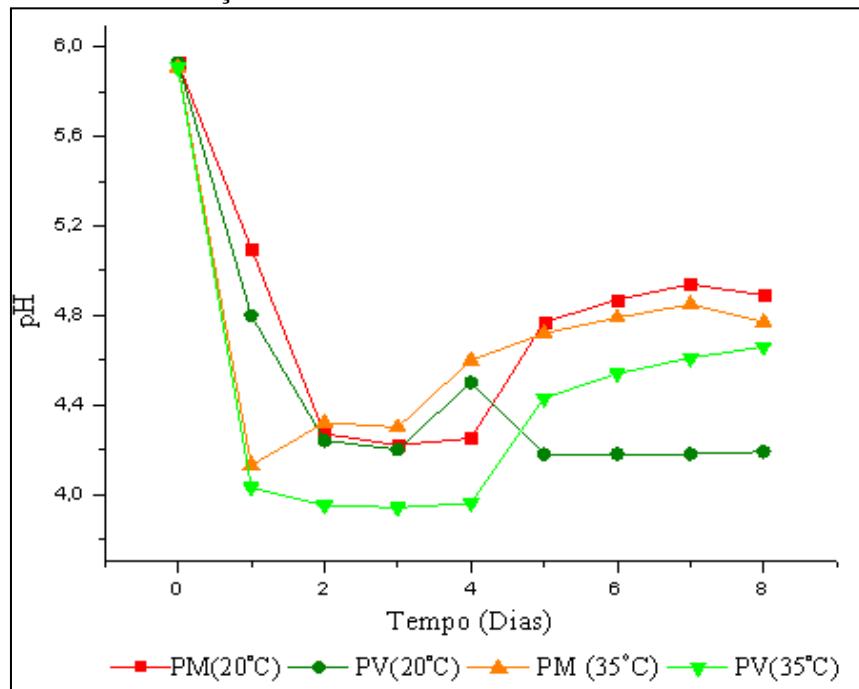
Por meio da Figura 8 são apresentados os valores de pH da salmoura (2% NaCl) em relação aos tempos de fermentação, referentes aos ensaios fermentativos espontâneos da pimenta de cheiro em diferentes estádios de maturação (madura e verde), com vistas à seleção da temperatura (20°C ou 35°C).

Os resultados de pH da salmoura em diferentes temperaturas de fermentação foram aproximadamente os mesmos, entre 5,91 e 5,93, no tempo 0, e depois de um dia de incubação foi observado uma rápida diminuição do pH em 1,78 e 1,88 unidades, na fermentação das pimentas madura e verde, respectivamente, à temperatura de 35°C. A 20°C, a diminuição do pH foi inferior aquela obtida à 35°C.

A partir do quinto dia de incubação observou-se aumento e semelhança entre os valores de pH na fermentação da pimenta madura nas duas temperaturas analisadas, assim como aumento do valor de pH na fermentação da pimenta verde a 35°C. Este aumento de pH, após cinco dias, provavelmente foi produzido concomitante com a metabolização do ácido láctico, devido possivelmente ao crescimento de deteriorantes que o consome, desencadeando a produção de produtos secundários de deterioração, tais como por exemplo o ácido propiônico e/ou o ácido butírico. Ao final do tempo estudado, somente a fermentação da pimenta verde a 20°C atingiu um pH seguro (4,18) abaixo de 4,5, caracterizando o final da fermentação.

A partir dos resultados obtidos apresentados na Figura 8, pode-se concluir que a melhor temperatura para o processo fermentativo foi a 20°C.

Figura 8 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro madura e verde, referente à pimenta madura (PM) e pimenta verde (PV), respectivamente, a diferentes temperaturas de incubação.



Através da avaliação visual, foram verificadas mudanças de coloração (tonalidade mais translúcida da pimenta), formação de películas, manchas esbranquiçadas com aspecto liso na superfície da pimenta em salmoura (conserva), já que esta se apresentava parcialmente submersa no meio, e o amolecimento da estrutura do pericarpo de alguns exemplares maduros e verdes ao longo da fermentação.

4.3 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VEGETAL SOBRE A FERMENTAÇÃO

Nas Figuras 9 e 10 estão apresentados os valores de pH em relação aos tempos de fermentação espontânea das pimentas de cheiro verde e madura, respectivamente, submetida a diferentes tipos de tratamento térmico.

De acordo com a Figura 9, os valores de pH iniciais foram aproximadamente os mesmos na fermentação com a pimenta sem tratamento e após o processo térmico a 85°C, de 6,46 e 6,39, e com a pimenta após branqueamento a 90°C e 95°C, 6,81 e 6,77, respectivamente. Após um dia de incubação, foi verificada uma queda de 1,15 unidades para o

valor de pH na amostra sem tratamento, quando comparada com a amostra submetida ao branqueamento.

Na fermentação com a pimenta verde submetida ao tratamento térmico a 85°C, maior estabilidade de pH foi alcançada a partir do quinto dia. A partir desse período, a incubação da amostra submetida à temperatura de 95°C apresentou menor valor de pH, com média de 3,77, quando comparada com os demais processos. O valor de pH aumentou rapidamente de 4,77 para 6,24, entre o 10º e o 15º dia, da fermentação da amostra submetida ao branqueamento a 90°C, e se manteve elevado, em comparação aos demais, até o final da fermentação (Figura 9).

Figura 9 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde após tratamento térmico (TT).

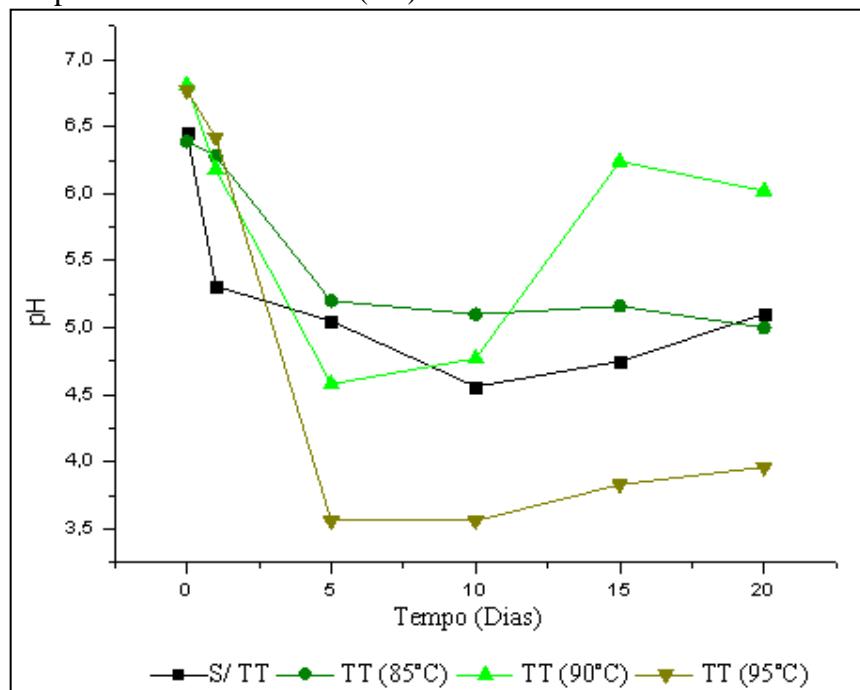
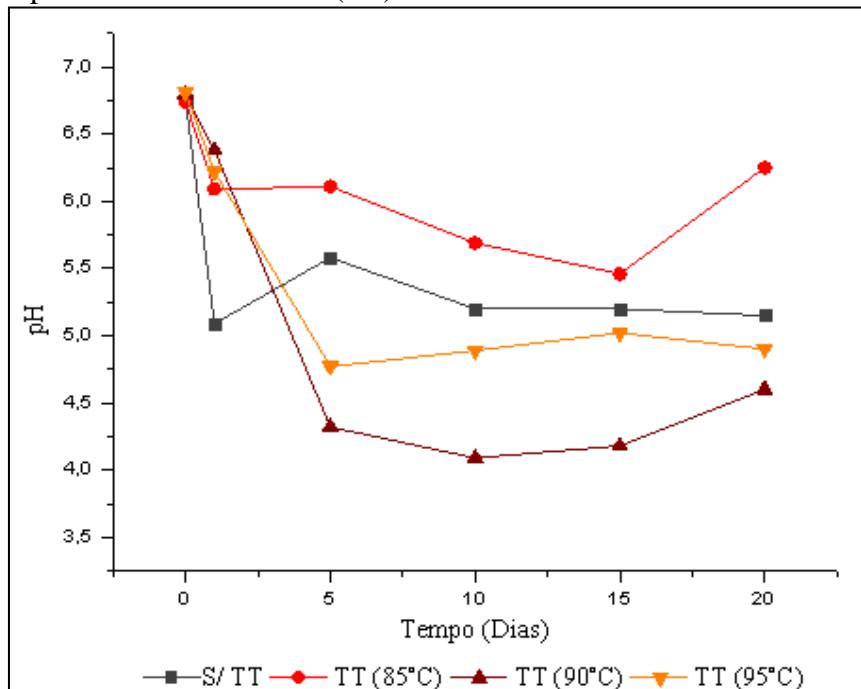


Figura 10 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro madura após tratamento térmico (TT).



Na Figura 10, os valores de pH iniciais foram similares na fermentação da pimenta em todos os tratamentos (sem e com branqueamento), variando entre 6,74 e 6,81. No primeiro dia de incubação houve um decréscimo de 1,66 unidades no valor de pH na fermentação da pimenta sem tratamento térmico, fato não observado nas demais condições estudadas.

No quinto dia, observou-se rápida diminuição no valor de pH de fermentação na amostra com pimentas tratadas a 90°C quando comparada com os demais tratamentos. Ao longo do tempo esta redução se manteve até o 15º dia. A partir do 10º dia, a incubação das pimentas sem tratamento térmico e aquelas submetidas a 95°C, apresentaram valores de pH estáveis até o término da fermentação. Ao final do tempo de processamento, somente a amostra submetida ao tratamento térmico a 85°C apresentou valor de pH de 6,25, podendo indicar a presença de micro-organismos deteriorantes que degradaram o ácido lático produzido, resultando na produção de metabólitos secundários de deterioração.

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 9 e 10), pode-se concluir que a temperatura de branqueamento a 85°C no vegetal foi à temperatura mais apropriada para o desenvolvimento do processo fermentativo.

Os resultados da contagem de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde e madura, sem e com tratamento térmico a diferentes temperaturas, estão apresentados na Tabela 2 e na Tabela 3,

respectivamente. Por meio da Tabela 2, observa-se, para as amostras de pimentas verdes tratadas termicamente, que os valores das contagens de mesófilos são diretamente proporcionais aos valores das temperaturas de tratamento das amostras, assim como nas amostras maduras submetidas ao processo de branqueamento a 85°C e 90°C. O tratamento térmico estimulou a germinação dos esporos presentes na matéria-prima que sobreviveram e até foram ativados durante o branqueamento e, na ausência da microbiota competitiva se proliferaram no produto. Estes micro-organismos apresentaram características típicas de *Bacillus* sp. através da sua morfologia. Em relação ao crescimento de fungos filamentosos e leveduras (Tabela 3), verificou-se que os resultados encontrados no tempo 0 após o branqueamento a 90°C e 95°C foram <1 Log UFC/mL nos dois estádios de maturação da pimenta, no entanto, o número de colônias, no decorrer do tempo, progrediu da mesma maneira que as contagens nos outros tratamentos.

As amostras de salmoura retiradas do recipiente sem a manutenção da anaerobiose do meio, assim como a temperatura de branqueamento, podem ter influenciado as altas contagens de micro-organismos ao longo da fermentação.

Ao final da fermentação foi observada uma diminuição na firmeza do pericarpo de algumas pimentas maduras em comparação às verdes, que se mostraram mais firmes e de aroma mais intenso. A demanda mercadológica para as notas sensoriais de cor específica da pimenta de cheiro refere-se a um produto de cor verde clara. Além disso, outras variações organolépticas, observadas no produto destinado ao consumidor final, foram os fatores responsáveis por estimular o estudo com pimentas aquém do estádio de maturação considerado maduro.

Tabela 2 – Contagem de mesófilos aeróbios na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde (PV) e madura (PM), respectivamente, sem e com tratamento térmico (TT) a diferentes temperaturas.

Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios (Log UFC/mL)							
	S/ TT		TT (85°C)		TT (90°C)		TT (95°C)	
	PV	PM	PV	PM	PV	PM	PV	PM
0	5,45 ± 0,48	5,42 ± 0,67	2,86 ± 0,82	5,64 ± 0,14	5,95 ± 0,05	8,39 ± 0,60	8,63 ± 0,30	7,54 ± 0,51
5	9,05 ± 0,48	7,27 ± 0,63	8,66 ± 0,14	8,61 ± 0,29	7,44 ± 0,61	6,59 ± 0,21	7,28 ± 0,02	6,43 ± 0,11
10	8,94 ± 0,63	9,31 ± 0,47	8,74 ± 0,16	8,85 ± 0,05	6,86 ± 0,12	7,13 ± 0,12	8,81 ± 0,07	7,54 ± 0,21
15	7,83 ± 0,07	8,59 ± 0,21	10,42 ± 0,68	9,23 ± 0,48	7,94 ± 0,71	9,23 ± 0,08	7,69 ± 0,12	8,64 ± 0,12
20	10,41 ± 0,58	10,34 ± 0,47	9,44 ± 0,54	8,39 ± 0,27	10,07 ± 0,51	8,97 ± 0,55	8,45 ± 0,83	9,99 ± 0,57

Tabela 3 – Contagem de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro verde (PV) e madura (PM), respectivamente, sem e com tratamento térmico (TT) a diferentes temperaturas.

Tempo (Dias)	Fungos filamentosos e leveduras (Log UFC/mL)							
	S/ TT		TT (85°C)		TT (90°C)		TT (95°C)	
	PV	PM	PV	PM	PV	PM	PV	PM
0	4,06 ± 0,61	3,30 ± 0,70	2,70 ± 0,27	4,26 ± 0,24	< 1	< 1	< 1	< 1
5	6,68 ± 0,08	6,45 ± 0,30	7,54 ± 0,23	5,38 ± 0,46	4,00 ± 0,48	3,73 ± 0,50	2,67 ± 0,65	3,09 ± 0,70
10	7,06 ± 0,47	6,18 ± 0,39	7,51 ± 0,37	5,16 ± 0,03	3,67 ± 0,58	6,33 ± 0,13	4,02 ± 0,05	3,20 ± 0,72
15	5,72 ± 0,71	6,54 ± 0,20	7,04 ± 0,42	4,65 ± 0,11	4,13 ± 0,15	7,51 ± 1,13	6,39 ± 0,39	3,21 ± 0,09
20	7,94 ± 0,02	5,39 ± 0,27	7,14 ± 1,38	4,68 ± 0,11	5,18 ± 0,07	6,61 ± 2,15	7,34 ± 0,26	7,34 ± 0,26

4.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA PIMENTA DE CHEIRO

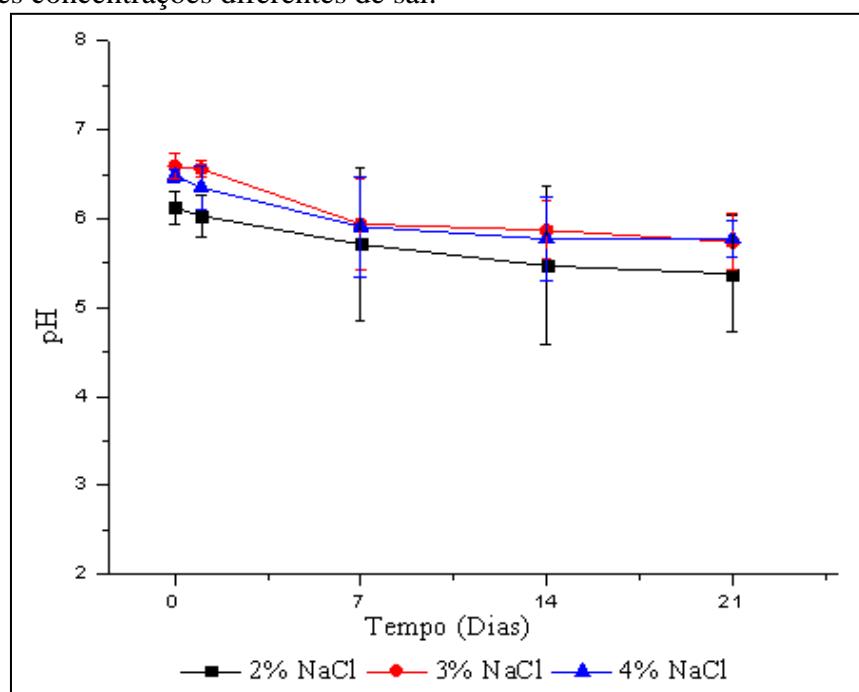
Na Tabela 4, estão apresentadas as contagens de micro-organismos na pimenta inteira pós-pasteurização ($85^{\circ}\text{C}/2\text{min}$) em diferentes lotes. Nestes lotes, não foram encontradas bactérias láticas, mesófilos totais e, fungos filamentosos e leveduras.

Tabela 4 – Contagens de micro-organismos em diferentes lotes de pimenta pós-pasteurização.

Lotes	Bactérias láticas (UFC/mL)	Mesófilos Totais (UFC/mL)	Fungos filamentosos e Leveduras (UFC/mL)
1º	< 1	< 1	< 1
2º	< 1	< 1	< 1
3º	< 1	< 1	< 1

A avaliação da fermentação espontânea com os vegetais submetidos ao processo de branqueamento, a partir dos resultados de pH e contagem de mesófilos, sob diferentes níveis de concentração de NaCl (2, 3 e 4%, p/v), em relação aos tempos de fermentação, estão apresentados na Figura 11 e na Tabela 5, respectivamente.

Figura 11 – Variação de pH na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro com três concentrações diferentes de sal.



Conforme ilustrado na Figura 10, os valores de pH iniciais na salmoura com diferentes concentrações de sal (2, 3 e 4%, p/v) estavam entre 6,12 e 6,59, na fermentação da pimenta de cheiro. Após um dia de incubação, os valores de pH não diminuíram acentuadamente. Posteriormente, ocorreram apenas pequenas diminuições nos valores de pH até final do processo fermentativo, que foi de 5,38 (2% NaCl), 5,74 (3% NaCl) e 5,78 (4% NaCl). O NaCl não teve influência estatisticamente significativa ($p>0,05$) nos valores de pH nos primeiros 7 dias de fermentação.

Tabela 5 – Contagem de mesófilos aeróbios na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro com três concentrações diferentes de sal.

Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios (Log UFC/mL)		
	Concentração de NaCl		
	2%	3%	4%
0	< 1	< 1	< 1
7	$6,44 \pm 0,94^a$	$6,00 \pm 0,66^a$	$6,39 \pm 0,33^a$
14	$6,94 \pm 0,73$	$6,54 \pm 0,13$	$6,81 \pm 0,38$
21	$7,01 \pm 0,11$	$6,88 \pm 0,45$	$6,87 \pm 0,61$

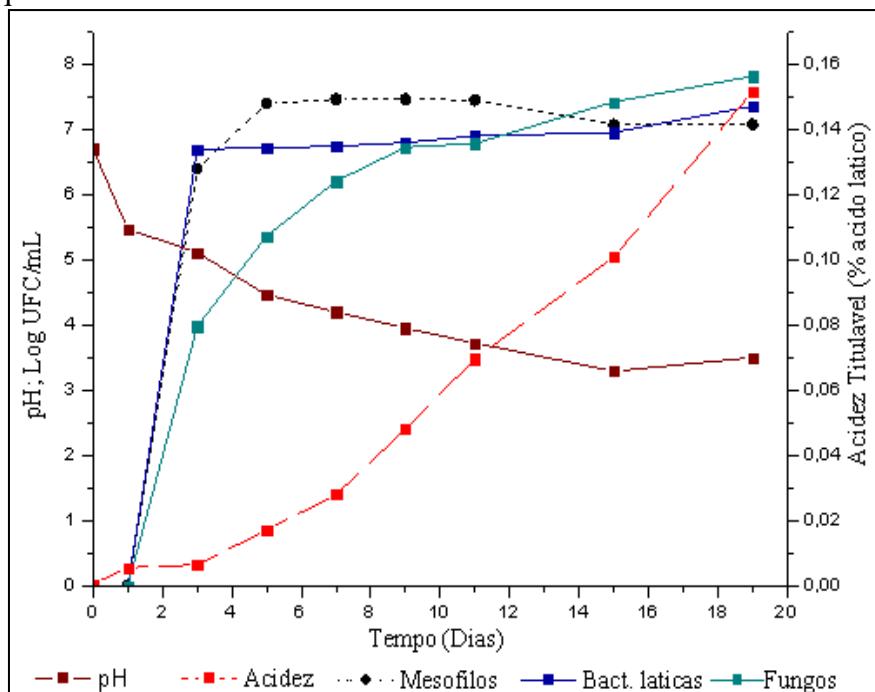
Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Os resultados das populações iniciais de mesófilos aeróbios na salmoura foram < 1 Log UFC/mL na fermentação da pimenta de cheiro (Tabela 5), no entanto, o número de colônias aumentou no decorrer do tempo nas três fermentações (2, 3 e 4% de NaCl, p/v). A partir do 7º dia de incubação observou-se crescimento dos micro-organismos deterioradores e, em seguida, aumento gradual, e na ausência da microbiota competitiva se proliferaram no produto. Ao final da fermentação, as contagens de mesófilos foram de 7,01, 6,88 e 6,87 Log UFC/mL a 2, 3 e 4% NaCl, respectivamente. Contudo, verificou-se que o sal não tem influência estatisticamente significativa ($p>0,05$) sobre o crescimento de mesófilos nos primeiros 7 dias de fermentação.

O número original de bactérias láticas na pimenta de cheiro foi de $4,88 \pm 0,43$ Log UFC/mL, e o seu potencial para iniciar a fermentação, foi avaliado a partir dos dados de pH, acidez titulável, expressa em porcentagem de ácido lático, contagem de mesófilos, bactérias láticas, fungos filamentosos e leveduras na salmoura (4% NaCl + 0,5% Glicose) em relação aos tempos de fermentação espontânea da pimenta de cheiro não submetida ao branqueamento, apresentados na Figura 12.

Da análise gráfica da Figura 12 referente à avaliação físico-química, observou-se que o valor de pH inicial na salmoura na fermentação da pimenta de cheiro não submetida ao branqueamento foi de 6,7. Após um dia de incubação, foi verificado uma queda de 1,23 unidades para o valor de pH. O pH diminuiu acentuadamente a partir do 5º dia para 4,46 e seguiu-se mais lentamente para um nível estável durante a fase estacionária de crescimento, em que o pH mínimo foi atingido no 15º dia de fermentação (3,25), enquanto, a acidez alcançou seu ponto máximo no 19º dia de fermentação (0,15%).

Figura 12 – Variação de pH, acidez titulável, contagem de mesófilos, bactérias láticas, fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação espontânea da pimenta de cheiro sem branqueamento.



As contagens microbianas de mesófilos, bactérias láticas, fungos filamentosos e leveduras, foram < 1 Log UFC/mL, no tempo 0 e após um dia de incubação, e em seguida, aumentou acentuadamente a partir do 3º dia, como ilustrado na Figura 12. Na fase exponencial, as taxas de crescimento de mesófilos e bactérias láticas foram aproximadamente às mesmas até o 3º dia de fermentação. Durante a fase estacionária relativamente longa, a contagem de mesófilos atingiu um valor máximo de 7,46 Log UFC/mL no 7º e 9º dia de fermentação, enquanto que, as bactérias láticas atingiram 6,92 Log UFC/mL aos 19 dias. Os fungos filamentosos e leveduras foram às espécies predominantes no final do processo fermentativo, atingindo 7,35 Log UFC/mL, no entanto, este dado é próximo aos resultados das contagens de mesófilos (7,07 Log UFC/mL) e bactérias láticas aos 19 dias.

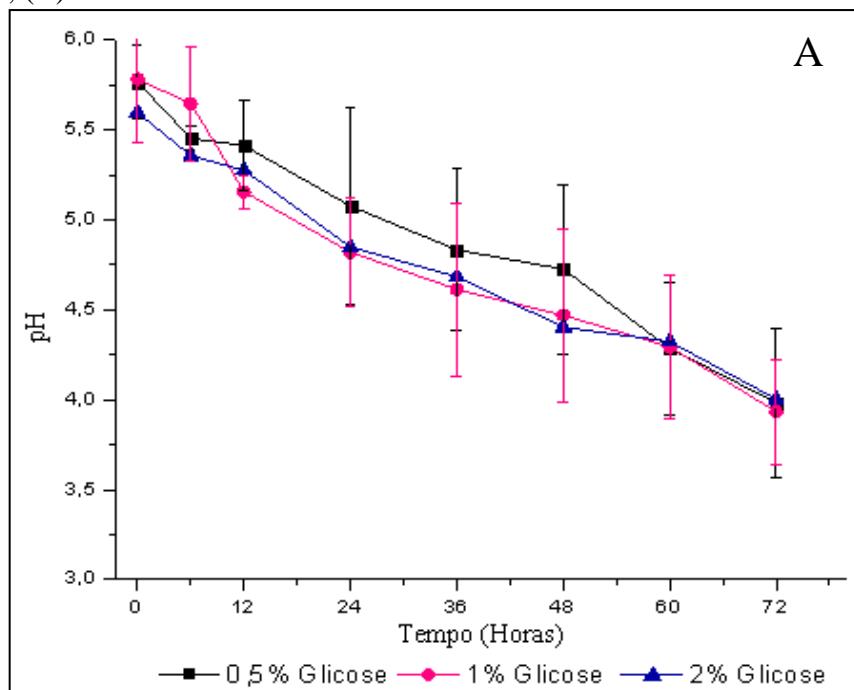
As contagens de bactérias láticas na pimenta de cheiro, após 19 dias de fermentação, foram inferiores a 10^6 UFC/mL. No entanto, a população de bactérias láticas na salmoura foi superior do que na matriz da pimenta.

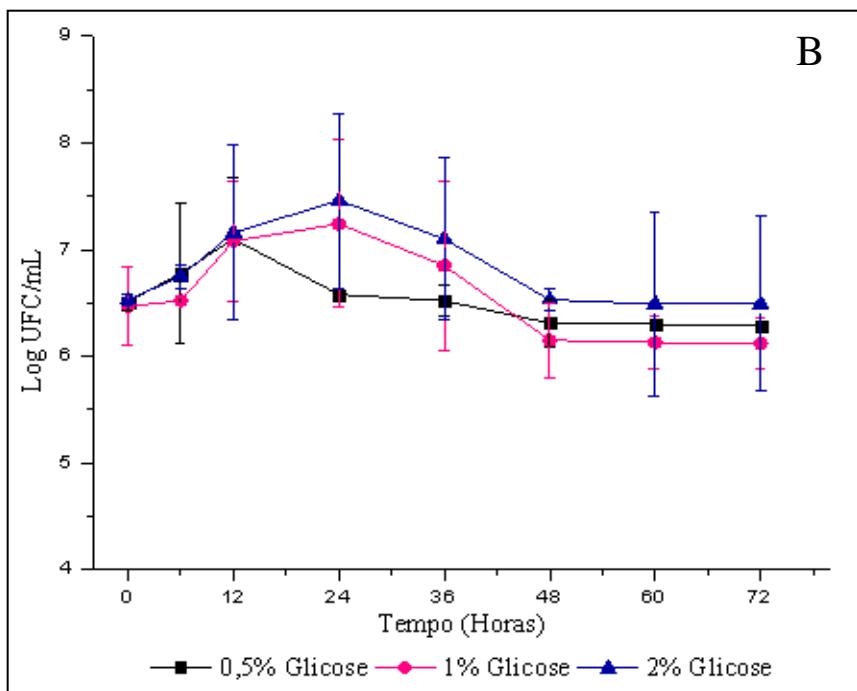
Na avaliação visual, foram observadas mudanças de coloração nas pimentas originalmente verdes brilhantes se tornaram verde oliva em ambas às formas de fermentação espontânea (com e sem branqueamento). Durante a fermentação com os vegetais não submetidos ao processo de branqueamento, a salmoura apresentou coloração mais turva do que o outro processo fermentativo.

4.5 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO COM *L. plantarum*

A avaliação da fermentação da pimenta de cheiro com *L. plantarum*, a partir dos resultados de pH e contagem de bactérias láticas na salmoura, referente aos ensaios sob a mesma concentração de NaCl (4%, p/v), diferentes concentrações de glicose (0,5, 1 e 2%, p/v) e inoculo inicial 6,5 Log UFC/mL, em relação aos tempos de fermentação, estão apresentados na Figura 13, e na Tabela 6, as contagens de fungos filamentosos e leveduras na salmoura.

Figura 13 – Variação de pH e bactérias láticas na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012 em três diferentes concentrações de glicose a 4% NaCl. (A) pH; (B) Bactérias Láticas.





De acordo com a Figura 13A, os valores de pH iniciais na salmoura a mesma concentração de sal 4% (p/v) e diferentes concentrações de glicose (0,5, 1 e 2%, p/v), estavam entre 5,60 e 5,78, na fermentação da pimenta de cheiro com cultura iniciadora. No primeiro dia de incubação houve um decréscimo de 0,69, 0,96 e 0,75 unidades no valores de pH em diferentes concentrações de glicose 0,5, 1 e 2% (p/v), respectivamente. Os valores de pH foram reduzindo gradualmente nas três concentrações, resultando em valores de pH final de 3,93 a 4,00. Nas amostras com 1 e 2% de glicose, a diminuição do pH para um valor seguro ocorreu em menor tempo, após 48h de fermentação, do que as amostras com 0,5% de glicose (60h). A glicose não teve efeito estatisticamente significativo ($p>0,05$) nos valores de pH nas primeiras 24h de fermentação.

A Figura 13B mostra o desenvolvimento de *L. plantarum* R1012 como cultura iniciadora em diferentes concentrações de glicose a 4% NaCl. O crescimento máximo das bactérias láticas foi obtida após 24h de fermentação, atingindo 7,24 e 7,46 Log UFC/mL, nas fermentações com 1 e 2% de glicose, respectivamente, enquanto que as amostras com 0,5%, atingiu 7,10 Log UFC/mL às 12h de fermentação. Após o crescimento exponencial cessar, os números de células viáveis rapidamente diminuíram, apresentando estabilidade a partir de 48h. Em diferentes concentrações de glicose não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) sobre o crescimento de bactérias láticas na salmoura nas primeiras 24h

de fermentação, mas comparando com as outras duas concentrações de glicose, em 0,5% de glicose obteve-se o menor resultado para a contagem de células viáveis.

Durante a fermentação da pimenta de cheiro com *L. plantarum*, as populações de fungos filamentosos e leveduras foram <10 UFC/mL, independente dos níveis de glicose a 4% NaCl utilizado no processo (Tabela 6).

Tabela 6 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012 em três diferentes concentrações de glicose a 4% NaCl

Concentração de glicose a 4% NaCl	Fungos filamentosos e Leveduras (UFC/mL)	
	0h	48h
0,5%	<10	<10
1%	<10	<10
2%	<10	<10

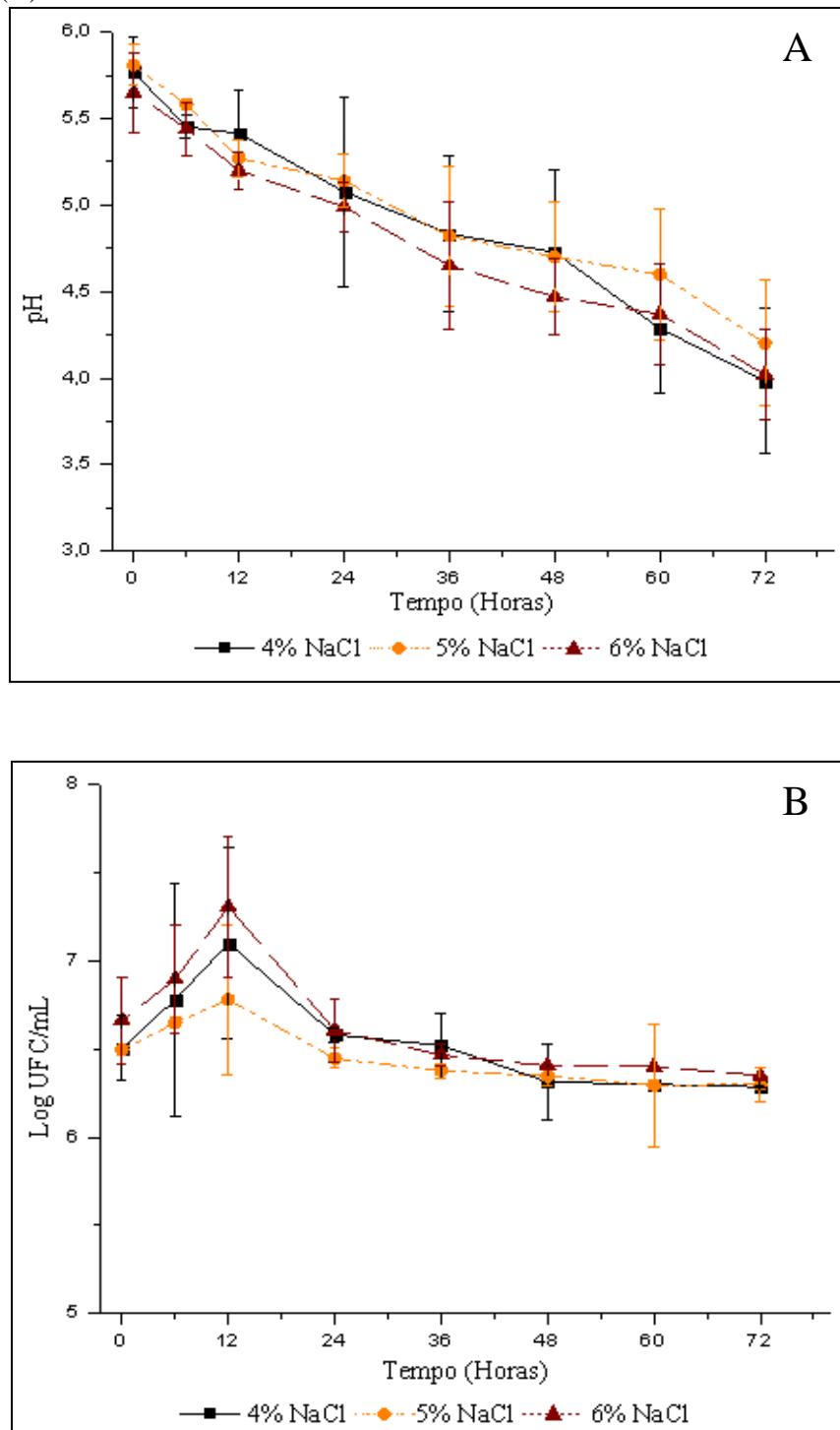
Na pimenta de cheiro, após 72h de fermentação, as contagens de bactérias láticas apresentaram valores médios de $9,20 \pm 0,15$, $9,04 \pm 0,22$ e $9,06 \pm 0,30$ Log UFC/mL em diferentes concentrações de glicose a 4% NaCl em salmoura, respectivamente. Também foi significativo que as condições que favoreceram o crescimento das bactérias láticas na pimenta, acima de 10^9 UFC/mL, não coincidiam com as condições que maximizavam o crescimento das bactérias na salmoura. Assim como na salmoura, a glicose não teve influência estatisticamente significativa ($p>0,05$) sobre o crescimento de bactérias láticas na pimenta.

Na Figura 14, estão apresentados os resultados de pH e contagem de bactérias láticas na salmoura em relação aos tempos de fermentação, referente ao estudo do efeito da concentração de sal (4, 5 e 6%, p/v) sob a mesma concentração de glicose (0,5%, p/v) e inoculo inicial com cerca de 6,5 Log UFC/mL, na fermentação da pimenta de cheiro com *L. plantarum*, e na Tabela 7, as contagens de fungos filamentosos e leveduras na salmoura.

A partir dos valores iniciais de pH da salmoura que foi de 5,77, 5,81 e 5,65 em diferentes concentrações de sal (4, 5 e 6%, p/v) suplementada com glicose a 0,5%, respectivamente, a redução do pH após 24h de fermentação foi similar em todas as amostras, com decréscimo de 0,69, 0,67 e 0,66 unidades, respectivamente (Figura 14A). Durante a fermentação, os valores de pH diminuíram, reduzindo para 3,98, 4,20 e 4,02 após 72h,

respectivamente. Portanto, o sal não teve efeito estatisticamente significativo ($p>0,05$) nos valores de pH durante as primeiras 12h de fermentação.

Figura 14 – Variação de pH e bactérias láticas na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012 em três diferentes concentrações de NaCl a 0,5% glicose. (A) pH; (B) Bactérias Láticas.



Conforme ilustrado na Figura 14B, as contagens de bactérias láticas na fermentação controlada da pimenta de cheiro em diferentes concentrações de sal a 0,5% de glicose atingiram valores máximos de 7,10, 6,78 e 7,31 Log UFC/mL, respectivamente, após 12h de fermentação. A partir deste período até ás 24h, há ligeira diminuição nas contagens de células e, em seguida, atingiram-se um nível estável. Verificou-se que o sal não teve influência estatisticamente significativa ($p>0,05$) sobre o crescimento de bactérias láticas em salmoura nas primeiras 12h de fermentação, mas a utilização de maiores concentrações de sal (6%) resultou em maior crescimento das bactérias.

No início e após 48h de fermentação, as contagens de fungos filamentosos e leveduras foram <10 UFC/mL na salmoura de NaCl a 4, 5 e 6% com glicose a 0,5%, como ilustrado na Figura 7.

Tabela 7 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012 em três diferentes concentrações de sal a 0,5% de glicose.

Concentração de sal a 0,5% glicose	Fungos filamentosos e Leveduras (UFC/mL)	
	0h	48h
4%	<10	<10
5%	<10	<10
6%	<10	<10

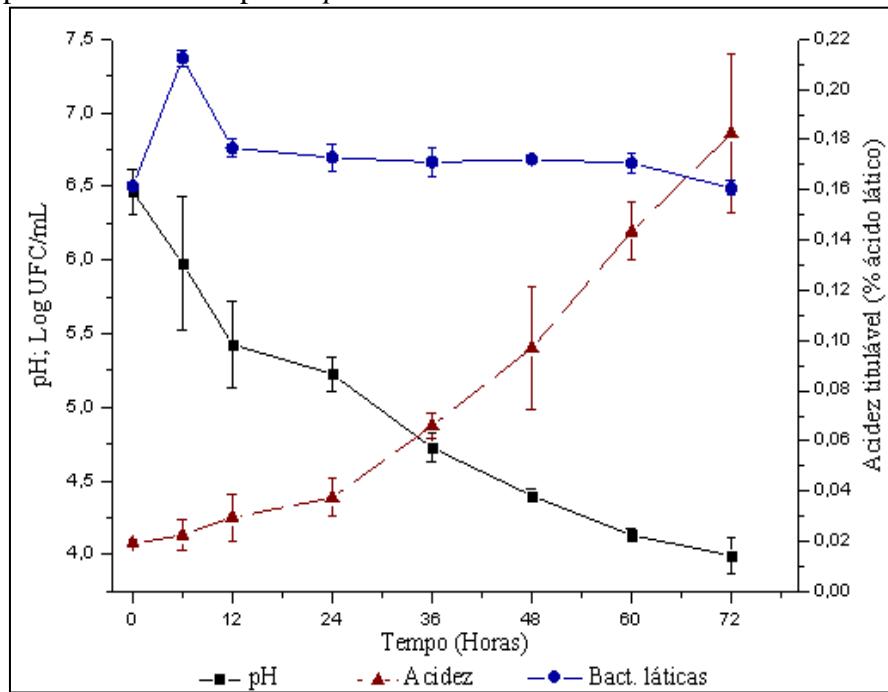
A adição de cultura starter sob a influência da concentração de sal a 0,5% de glicose em salmoura assegurou altas contagens de bactérias láticas na pimenta de cheiro, após 72h de fermentação, do que na própria salmoura, apresentando valores médios de $9,20 \pm 0,15$, $9,34 \pm 0,31$ e $9,37 \pm 0,45$ Log UFC/mL, respectivamente, assim como nas amostras sob o efeito da concentração de glicose a 4% NaCl.

A qualidade sensorial da pimenta de cheiro, determinada pelos responsáveis da pesquisa (não científico), foi realizada nas diferentes salmouras após 72h de incubação a 20°C. Em todas as amostras, a firmeza, o aroma e a cor verde oliva do vegetal fermentado tinham as mesmas características. A adição da cepa de *L. plantarum* contribuiu para intensificar o aroma e o sabor característico do vegetal e do produto fermentado, devido à produção de ácido lático. Quanto ao sabor, a adição de diferentes níveis de glicose na salmoura (4% NaCl, p/v) foi insignificante para este atributo, mas a presença de NaCl,

contribuiu para o mesmo. A maior concentração de NaCl testada (6%, p/v) realçou o sabor da pimenta de cheiro e mesmo em maior nível, o gosto salgado quando comparado as outras amostras, não teve efeito significativo, devido provavelmente ao formato em que foi fermentada (inteira).

Os resultados de pH, acidez e contagem de bactérias láticas na salmoura, em relação aos tempos de fermentação, referente a fermentação da pimenta de cheiro com *L. plantarum* a partir do estudo de eventuais correlações entre os teores de glicose, sal e cultura starter (6% NaCl + 2% glicose + 6,5 Log UFC/mL), estão apresentados na Figura 15, e na Tabela 8, os resultados da contagem de fungos filamentosos e bolores.

Figura 15 – Variação de pH, acidez e bactérias láticas na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012.



Durante o processo fermentativo, o valor de pH na salmoura diminuiu de 6,5 no ínicio para 3,99 no final da fermentação e a acidez titulável, de 0,02% aumentou para 0,18%, como ilustrado na Figura 15. A população de bactérias láticas na salmoura atingiu o valor máximo de crescimento em apenas 6 horas de fermentação, apresentando um valor de 7,37 Log UFC/mL. Contudo, a partir deste período, há um declínio destas colônias (Figura 15). Quanto as populações de fungos filamentosos e leveduras na salmoura, as contagens foram inferiores a 10 UFC/mL (Tabela 8).

Tabela 8 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na salmoura durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012.

Tempo (Horas)	Fungos filamentosos e leveduras (UFC/mL)
0	<10
24	<10
48	<10
72	<10

O efeito benéfico da adição de cultura starter na fermentação da pimenta de cheiro, em 6% de NaCl e 2% de glicose em salmoura, é também exemplificado nas altas contagens de bactérias láticas na pimenta com valor de $9,28 \pm 0,099$ Log UFC/mL, após fermentação.

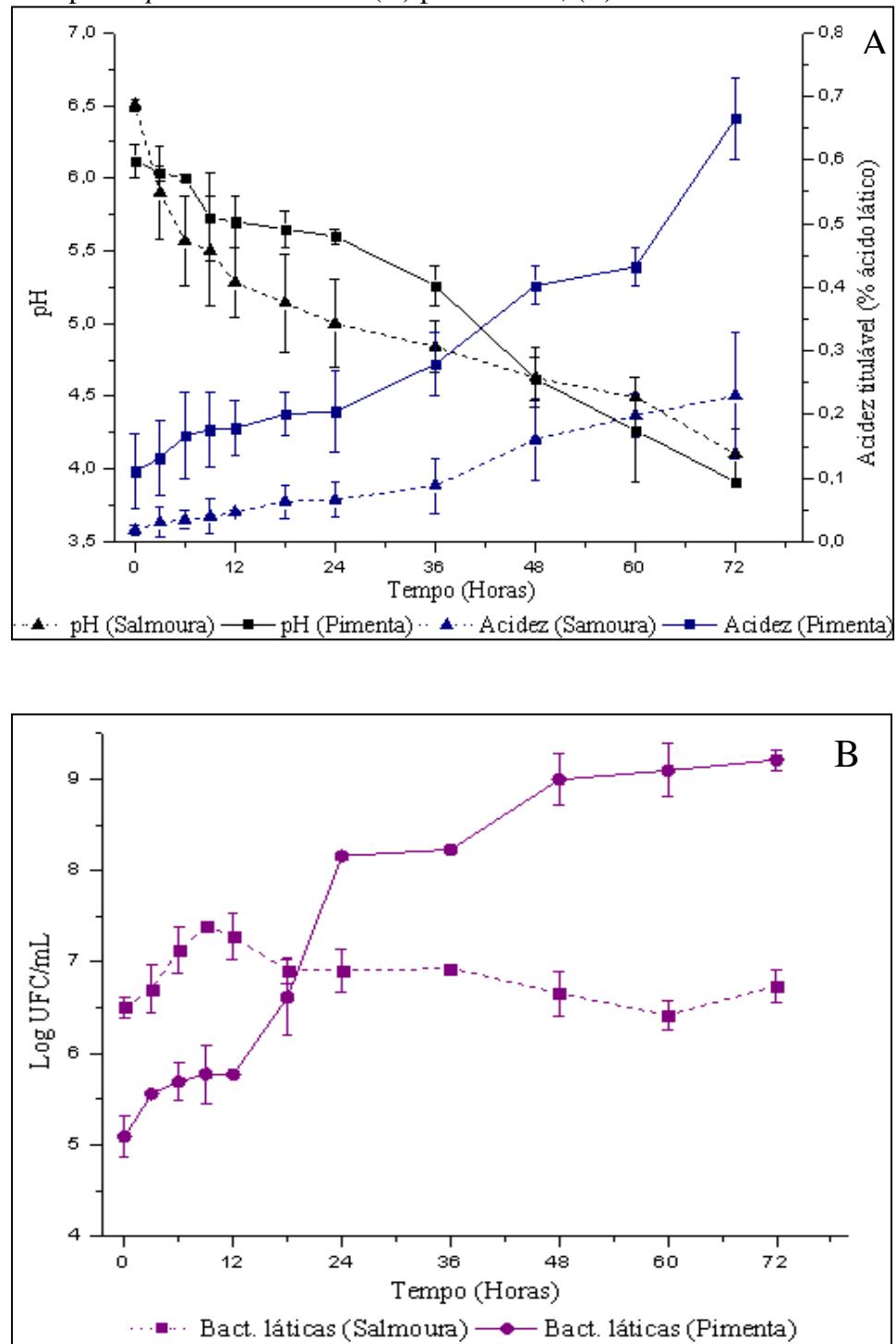
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL

O produto final da fermentação da pimenta de cheiro em salmoura a 6% de NaCl, 2% de glicose e adição de *L. plantarum* (6,5 Log UFC/mL) pode ser observado na Figura 16. As variações de pH, acidez titulável e as populações de bactérias láticas no vegetal fermentado e na salmoura, em relação aos tempos de fermentação, estão apresentados na Figura 17, e na Tabela 9, as contagens de fungos filamentosos e leveduras.

Figura 16 – Pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) fermentada em salmoura



Figura 17 – Variação de pH, acidez e bactérias láticas durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012. (A) pH e acidez; (B) Bactérias láticas.



Inicialmente, verificou-se que o valor de pH na pimenta de cheiro foi de 6,12 e acidez titulável de 0,11%, enquanto a salmoura apresentou um pH de 6,5 e acidez de 0,018% (Figura 17A). Após um dia de incubação, o valor de pH da salmoura apresentou uma rápida diminuição em 1,5 unidades, em comparação ao pH do vegetal fermentado que foi de 0,52

unidades. É interessante ressaltar que a queda de pH foi mais rápida na salmoura até 48h, mas a partir deste período um menor valor de pH foi registrado para o vegetal fermentado. Como resultado, os valores finais de pH da salmoura e da pimenta foram de 4,10 e 3,91, respectivamente. Maiores concentrações de ácido lático foram observadas no vegetal fermentado durante todo período fermentativo, apresentando um valor final de acidez titulável de 0,67%, em comparação ao valor determinado na salmoura (0,23%).

A Figura 17B descreve o crescimento das bactérias lácticas na salmoura e na pimenta de cheiro durante o processo fermentativo. Inicialmente, as contagens de bactérias lácticas no vegetal estavam presentes em números baixos, seguidos por um rápido aumento a partir de 18h até o final da fermentação, isto é, 9,21 Log UFC/mL, enquanto que na salmoura o maior número de células foi observado em 9h, com valor de 7,40 Log UFC/mL. Em relação as populações de fungos filamentosos e leveduras, tanto na salmoura quanto na pimenta, as contagens foram inferiores a 10 UFC/mL (Tabela 9).

Tabela 9 – Variação de fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação da pimenta de cheiro por *L. plantarum* R1012.

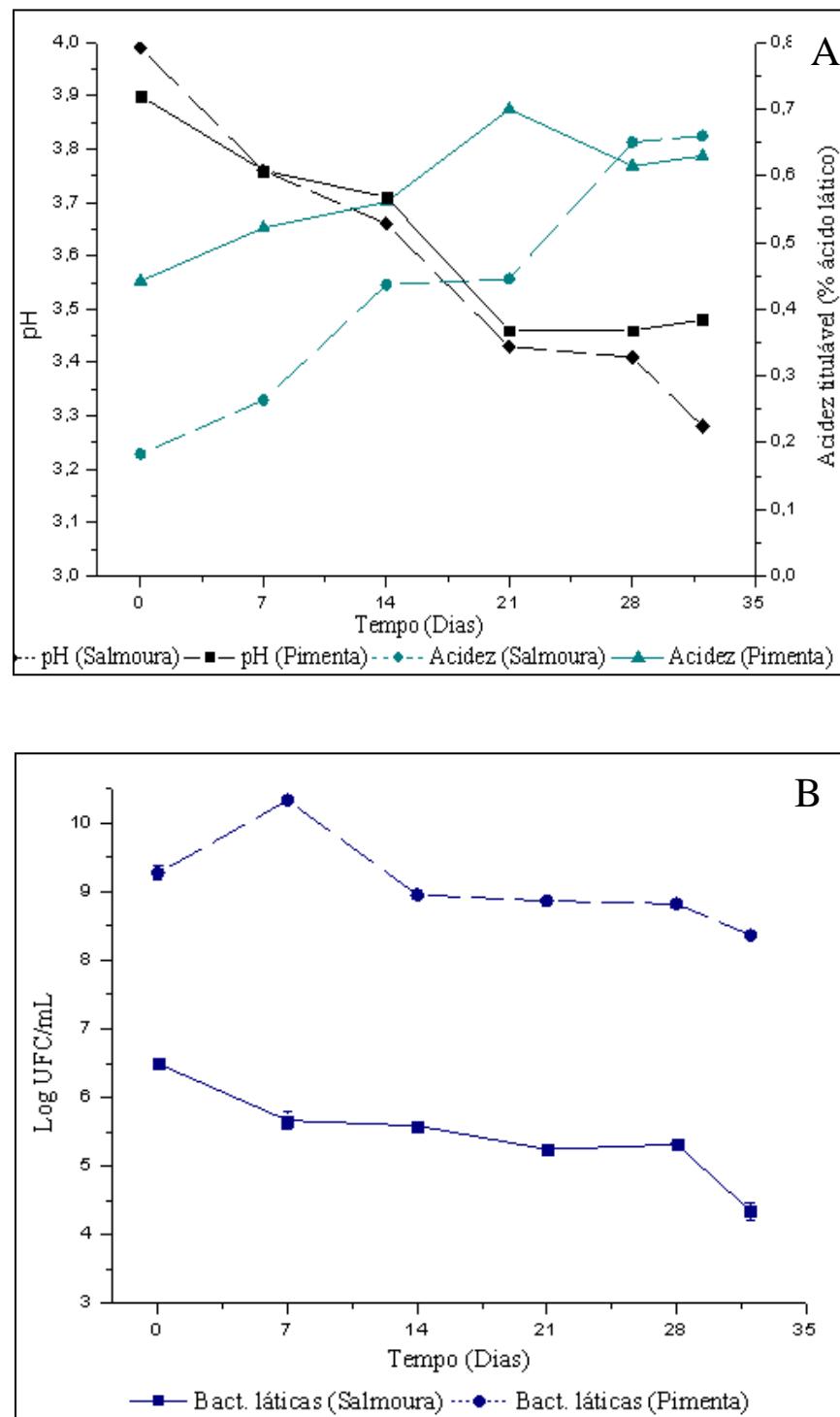
Tempo (Horas)	Fungos filamentosos e leveduras (UFC/g)	
	Salmoura	Pimenta
0	<10	<10
24	<10	<10
48	<10	<10
72	<10	<10

4.7 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA PIMENTA FERMENTADA COM *L. plantarum* SOB REFRIGERAÇÃO

Os resultados da viabilidade microbiológica e as características físico-químicas da pimenta fermentada com *L. plantarum* durante o armazenamento em refrigeração a 4°C, estão apresentados na Figura 18. De acordo as análises físico-químicas, verificou-se que houve decréscimo de pH e aumento da acidez ao longo do armazenamento na salmoura e no vegetal, exceto no valor de acidez a partir do 21º dia na pimenta, devido à contínua produção de ácido lático pelas bactérias lácticas (Figura 18A). O valor inicial de pH na salmoura de 3,99 diminuiu

para 3,28 ao final da estocagem e a acidez titulável, de 0,18% aumentou para 0,66%. No vegetal, o pH de 3,9, no tempo 0 de estocagem, diminui para 3,48 e a acidez, de 0,44% aumentou para 0,63%, mas o teor máximo em acidez (0,76%) foi observado no 21º dia de armazenamento.

Figura 18 – Variação de pH, acidez e bactérias láticas na pimenta de cheiro fermentada por *L. plantarum* R1012 durante o armazenamento sob refrigeração a 4°C. (A) pH e acidez; (B) Bactérias láticas.



Durante o armazenamento refrigerado, a contagem de bactérias láticas no tempo 0 foi de 9,27 Log UFC/mL no vegetal fermentado, apresentando aumento de um ciclo logarítmico após 7 dias (10,33 Log UFC/mL), no entanto, a partir deste período houve redução de ~1,4 a 2 ciclos logarítmicos, apresentando valores de 8,95 Log UFC/mL no 14º dia, 8,86 Log UFC/mL no 21º dia, 8,82 Log UFC/mL no 28º dia e 8,36 Log UFC/mL no 32º dia de armazenamento. Quanto à salmoura, a contagem inicial de células viáveis foi de 6,49 Log UFC/mL, diminuindo ao longo do armazenamento, apresentando redução de ~2 ciclos logarítmicos ao final (4,34 Log UFC/mL).

A evolução da população de fungos filamentosos e leveduras (Tabela 10) ao longo dos 32 dias de armazenamento diminuíram gradualmente para níveis <1 UFC/mL, a partir da concentração inicial <10 UFC/mL, tanto na salmoura como no vegetal fermentado.

Tabela 10 – Variação de fungos filamentosos e leveduras na pimenta de cheiro fermentada por *L. plantarum* R1012 durante o armazenamento sob refrigeração a 4ºC.

Tempo (Dias)	Fungos filamentosos e leveduras (UFC/mL)	
	Salmoura	Pimenta
0	<10	<10
7	<10	<10
14	<1	<1
21	<1	<1
28	<1	<1
32	<1	<1

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PIMENTA DE CHEIRO

As alterações na composição físico-química da pimenta são considerações nutricionais importantes que podem variar de acordo com a espécie, o cultivar, as condições de cultivo como o tipo de solo e a época do ano, e a maturação dos frutos (PINTO, PINTO, DONZELES, 2013), que determinam os padrões de qualidade.

A quantidade de sólidos solúveis totais, o pH e a acidez titulável, desempenham um papel importante na manutenção da qualidade dos frutos e refletem o estádio de maturação dos mesmos, sendo essas características responsáveis pelo sabor e aroma dos frutos (SANTANA; MATSUURA; CARDOSO, 2004).

O pH para a pimenta de cheiro *in natura* madura foi de 5,13 (Tabela 1), este valor foi semelhante aos observados por Borges *et al.* (2015) em Roraima, que encontraram valores de 4,98 a 5,45 em pimentas da espécie *Capsicum chinense*. Em Tocantins, Cerqueira (2012) verificou que a pimenta de cheiro *in natura* verde apresentou valor médio de 5,0 mesmo com pequena oscilação ao longo do armazenamento em diferentes embalagens, apresentando assim valores inferiores aos encontrados nesse experimento para o pH da pimenta de cheiro *in natura* verde, com média de 5,77. A medida do pH é um parâmetro importante para o controle da deterioração do produto, devido à presença e crescimento de micro-organismos nocivos à saúde na faixa de pH em torno da neutralidade (6,5-7,5) (BRAGA *et al.*, 2013).

Os teores de sólidos solúveis totais foram iguais a 6 °Brix na pimenta madura e 5 °Brix na verde, sendo os valores de sólidos solúveis do vegetal verde similares aos relatados por Borges *et al.* (2015), de 4,6 °Brix, ao caracterizar a pimenta verde da espécie *C. chinense*; e Cerqueira (2012), de 3,25 a 6,03 °Brix, na avaliação da pimenta de cheiro *in natura* verde ao longo do armazenamento.

A acidez titulável expressa em ácido cítrico na pimenta madura e verde apresentou média de 0,22% e 0,19%, respectivamente. Esses valores foram superiores ao descrito em Cerqueira (2012), com média de 0,13% para a acidez da pimenta de cheiro *in natura* verde. Em outras variedades de pimentas da espécie *C. chinense* constataram-se valores de 0,202% a 0,561% de acidez (BORGES *et al.*, 2015).

A determinação de umidade na pimenta madura foi de 89,94%, e na verde, 91,76% (Tabela 1), apresentando conformidade com os resultados obtidos por Carvalho *et al.* (2014), avaliando nove genótipos de *Capsicum* spp. em dois estádios de maturação do Banco de

Germoplasma da Empraba Amazônica Oriental em Belém-PA, onde encontraram valores de umidade variando de 81,46% a 91,42%, para as pimentas imaturas (verdes), e de 78,19% a 89,39%, para as maduras, sendo assim perda de umidade com o amadurecimento dos frutos devido ao aumento da atividade respiratória.

O teor de cinzas representa a determinação mineral presente nos vegetais. As cinzas observadas na pimenta madura (0,62%) e verde (0,51%) estão acima dos resultados obtidos por Carvalho (2014), com teores médios de 0,434 e 0,368 mg/100g na pimenta *in natura* verde e madura, respectivamente, estudando a composição centesimal da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) em diferentes estádios de maturação oriundas do comércio local de Belém-PA.

No que se refere aos valores encontrados para proteínas, constatou-se média de 1,23%, para a pimenta madura e 0,86%, para a verde. Valores estes inferiores ao encontrado por Carvalho (2014), que foi de 5,358 e 6,575 g/100g, na pimenta de cheiro *in natura* verde e madura, respectivamente, obtido em Belém-PA.

A quantidade de lipídeos encontrada no estudo de 0,60 e 0,35% na pimenta madura e verde, respectivamente, foi superior ao encontrado por Carvalho (2014), que obteve 0,367 e 0,456 g/100g na pimenta de cheiro *in natura* verde e madura, respectivamente, obtido em Belém-PA. Dambros (2014), avaliando dez acessos de pimentas *Capsicum* spp. e a pimenta dedo de moça, relataram valores que oscilaram de 0,21% a 1,10%, e 0,28%.

Considerando o resultado de carboidratos, verificou-se que a pimenta madura apresentou maiores valores (7,61%) em comparação à pimenta verde (6,51%). Estes valores são superiores ao encontrado por Oliveira (2011) que ao avaliarem a composição centesimal das pimentas do gênero *Capsicum* spp., encontrou o valor de 4,94% de carboidratos para a pimenta de cheiro (*C. chinense*) e inferiores ao resultado de 0,25 e 0,118 g/100g na pimenta verde e madura, respectivamente, apresentado por Carvalho (2014), obtido em Belém-PA.

A composição centesimal da pimenta de cheiro no presente estudo é semelhante à composição dos vegetais mais frequentemente utilizados em fermentações lácticas. O repolho, o pepino e as azeitonas são os vegetais mais utilizados nas fermentações, e estas matérias primas são alimentos que apresentam alta umidade, baixo teor em proteínas, em carboidratos fermentescíveis e em gordura (à exceção das azeitonas). A faixa dos compostos são os seguintes: umidade de 92 - 94%, 95%, e 78 - 80%; carboidratos de 5 - 6%, 2 - 3%, e 2 - 4%; proteína de 1%, 1%, e 1 - 2 %, para o repolho, pepino e azeitonas, respectivamente, e lipídeos de 12 - 14% para as azeitonas (HUTKINS, 2006).

5.2 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO

A partir dos resultados obtidos no estudo (Figura 8), pode-se inferir que tanto a temperatura de incubação quanto o estádio de maturação do vegetal afetam o processo fermentativo espontâneo. O ensaio fermentativo da pimenta de cheiro no estádio verde a 20°C foi o que apresentou condições de pH mais favoráveis à fermentação. No entanto, esta mesma temperatura não criou condições favoráveis para manter a redução do pH até o final do processo com o vegetal maduro, devido possivelmente ao crescimento de micro-organismos deteriorantes como certos tipos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Com o aumento da faixa de temperatura na fermentação natural a 35°C, os micro-organismos deteriorantes proliferaram, o que resultou na elevação do pH a partir do quarto dia nos dois estádios de maturação analisados.

De acordo com Goldoni e Goldoni (2001), a elevação do pH no final da fermentação, com a possibilidade do crescimento de micro-organismos deteriorantes menos tolerantes à acidez, é causada pelo desenvolvimento de leveduras, que sempre estarão presentes, devendo-se evitar ao máximo o seu crescimento, principalmente as oxidativas ou superficiais, dada à existência de maiores teores de ácido lático que é consumido pelas mesmas. A atividade metabólica dessas leveduras pode favorecer o desenvolvimento de outras bactérias de deterioração, tais como o *Clostridium* e as *Enterobacterceae* (FRANCO; PÉREZ-DÍAZ, 2012).

A presença de películas, manchas esbranquiçadas, mudanças de coloração e amolecimento das amostras estudadas é resultado do crescimento de leveduras responsáveis por muitas das condições indesejáveis para a fermentação. Estas películas na superfície das amostras são formadas por leveduras oxidativas que oxidam o ácido lático, ocasionando um aumento de pH que pode contribuir na deterioração do produto (PEREIRA *et al.*, 2008). O amolecimento das amostras está relacionado com a hidrólise do material pectíco através da atividade pectinolítica de micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos e bactérias do gênero *Bacillus* ou causado pelas próprias enzimas das amostras (GOLDONI; GOLDONI, 2001; HUTKINS, 2006).

5.3 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VEGETAL SOBRE A FERMENTAÇÃO

Os resultados dos tratamentos térmicos na pimenta de cheiro a 85°C, 90°C e 95°C por 2 minutos como um procedimento bactericida sobre a fermentação, devido à redução do uso de sal, foram negativos em relação à amostra sem tratamento para as temperaturas testadas. No grupo controle, sem tratamento térmico, as bactérias selvagens presente na microbiota nativa do vegetal cresceram e uma diminuição do pH foi observada como esperado, entretanto, esta mesma diminuição foi mais brusca nos grupos com branqueamento, à exceção da fermentação da pimenta no estádio verde e madura submetida ao branqueamento à 85°C que apresentou os melhores resultados (Figuras 9 e 10). Após cada tratamento, em ambos os estádios de maturação, as contagens de micro-organismos mesófilos, fungos filamentosos e leveduras (Tabelas 2 e 3) foram elevados e, possivelmente, foi influenciada pelo meio sem a manutenção da anaerobiose, aplicação de calor insuficiente e baixa concentração de sal utilizada (2% NaCl) para a inativação dos micro-organismos deteriorantes.

Segundo Furtado e Dutra (2012), as pimentas têm pH próximo de 6,0, sendo classificadas como alimentos de baixa acidez. O tratamento térmico indicado para alimentos de baixa acidez é a esterilização, empregando temperaturas superiores a 100°C. Na pimenta, esse tipo de tratamento causa alterações indesejáveis no produto final e a forma mais adequada de conservação do produto é a acidificação, seguida de tratamento térmico.

Em virtude da inviabilidade de um tratamento térmico a 100°C, visando à preservação dos compostos funcionais e às características sensoriais da pimenta, a combinação de maiores teores de sal com meios fermentativos microaerofílicos controlados são necessários. Alguns autores relatam que a concentração de sal na salmoura deve situar-se na faixa de 4 a 6%, pois favorecem a fermentação láctica. Concentrações mais elevadas de NaCl nas salmouras afetam o crescimento destes micro-organismos e promovem o crescimento de leveduras resultando em um produto final de pH mais elevado e menos ácido. A salmoura com 8% de NaCl, pode induzir a inibição do crescimento de bactérias lácticas, independentemente da temperatura de fermentação (TASSOU; PANAGOU; KATSABOXAKIS, 2002).

No processo fermentativo da pimenta de cheiro, o grau de maturação pode ter influenciado as características do produto, independente do tratamento térmico submetido ao fruto, pois algumas pimentas maduras apresentaram menor grau de enrijecimento do pericarpo. Com o amadurecimento, há o aumento do teor de sólidos solúveis em conjunto com a diminuição da rigidez, promovendo o amolecimento característico de frutos maduros.

Sendo assim, menor alteração nas propriedades sensoriais ocorreu quando a fermentação foi realizada com os frutos verdes.

5.4 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA PIMENTA DE CHEIRO

A microbiota natural das matérias-primas frescas podem variar de acordo as condições de cultivo como o tipo de solo, clima e época de colheita. Ocasionalmente, isso pode afetar negativamente as fermentações e para inibir os micro-organismos indesejáveis, o tratamento térmico na pimenta foi avaliado. As contagens de bactérias láticas, mesófilos totais e fungos filamentosos e leveduras nas amostras de pimenta foram <1 UFC/mL após o tratamento térmico (Tabela 4), demonstrando que o processo de branqueamento foi eficiente na redução da carga inicial destes micro-organismos.

As fermentações espontâneas dos vegetais dependem principalmente das atividades competitivas de uma variedade de micro-organismos autóctones e contaminantes, devido à diversidade de organismos presentes nos vegetais crus (RODRIGUEZ *et al.*, 2009), e a fim de minimizá-los, procedeu-se, então, ao tratamento térmico, análises fermentativas com três níveis de concentração de sal, 2, 3 e 4% (p/v).

A partir dos resultados do presente estudo, em diferentes concentrações de NaCl, observou-se que o crescimento de bactérias láticas foi inibido independente da concentração de sal na salmoura, uma vez que, não ocorreu diminuição do pH para um valor seguro, apresentando valores de pH final de 5,38, 5,74 e 5,78 em 2, 3 e 4% NaCl, respectivamente, e como consequência, prevaleceu o desenvolvimento da microbiota deteriorante (Tabela 5). Este resultado confronta ao exposto por Swain *et al.* (2014), ao relatarem que o principal papel do sal é promover o crescimento das bactérias láticas em relação às bactérias de deterioração, ao criar condições anaeróbias em torno do produto submerso, além de inibir a ação das enzimas que podem causar amaciamento vegetal e posterior putrefação.

As baixas concentrações de cloreto de sódio nos três ensaios do primeiro grupo não foram limitantes para impedir o crescimento das bactérias láticas, já que de acordo com González-Quijano *et al.* (2014), as altas concentrações de NaCl (8,42%) utilizada na fermentação espontânea da pimenta jalapeño, induziu o crescimento das bactérias láticas, atingindo 8,06 Log UFC/mL após 28h de fermentação, com *Lactobacillus* spp. dominantes na fermentação. No entanto, estes resultados são discrepantes aos encontrados por Xiong *et al.* (2016), ao demonstrarem que a fermentação do chucrute por diferentes concentrações de sal

(2, 5 e 8%, p/v) afetou significativamente a fase inicial da fermentação. Em 2% de NaCl o crescimento dos micro-organismos nocivos não foram inibidos efetivamente e a 8%, o metabolismo das bactérias láticas foi retardado. Enquanto que a 5% de sal, a qualidade do chucrute na fermentação tradicional pôde ser melhorada. Em suma, a população de bactérias láticas e a taxa metabólica foram reduzidas e o rendimento de ácido lático diminuiu com o aumento da concentração de sal.

A maioria dos estudos relacionados aos processos fermentativos da pimenta tem sido elaborada com a matéria-prima cortada em fatias uniformes ou em tiras finas, e com sementes (DI CAGNO *et al.*, 2009; GONZÁLEZ-QUIJANO *et al.*, 2014), já que segundo Swain *et al.* (2014), as condições anaeróbicas são mais eficazes desta forma. Portanto, maior é a disponibilidade dos nutrientes no meio para os micro-organismos iniciarem a fermentação. Neste estudo, as pimentas foram fermentadas inteiras, visando à escala industrial, o que pode ter contribuído para a inibição da fermentação espontânea, altamente dependente dos micro-organismos na matéria-prima e das condições anaeróbicas, pH, temperatura e substratos.

Lima *et al.* (2006), avaliaram o processo fermentativo para produção de picles de maxixes (*Cucumis anguria* L.) sob duas diferentes formas: inteiros e cortados em rodelas de 1 cm de espessura, em diferentes concentrações de NaCl (5, 10 e 20%, p/v), e concluíram que as fermentações com os maxixes cortados em rodelas apresentaram os melhores resultados (maior acidez) que os obtidos com o vegetal inteiro e que o aumento da concentração de sal inibiu a produção de ácido lático, independente do formato do maxixe, durante a fermentação.

Em um estudo de produção de picles (não fermentados) de pimentas jalapeño inteiras através de um processo de cura em uma solução de cloreto de sódio e ácido acético, foram testadas dois modos de produção, com e sem aplicação do pulso de vácuo (666 mbar/5min) no início do processo. Os resultados obtidos indicaram que a aplicação do pulso de vácuo na conserva da pimenta inteira acelerou e reduziu o tempo de produção, cerca de 30 a 15 dias, em comparação com o processo industrial à pressão atmosférica. Com a aplicação do vácuo, o gás ocluso nos poros ou capilares dos tecidos dos vegetais é removido, o que contribui para o preenchimento dos poros da matriz da pimenta com a solução externa através do mecanismo hidrodinâmico, este tratamento permite atingir, em menor tempo, níveis mais elevados de agentes conservantes nos tecidos da pimenta, evitando à deterioração (MÚJICA-PAZ *et al.*, 2006). Assim, a aplicação do pulso de vácuo poderia ser uma alternativa na elaboração de pimentas inteiras fermentadas, com vegetais submetidos ao tratamento térmico e a utilização de baixas concentrações de sal, como no referido estudo para melhorar as condições de anaerobiose para o crescimento das bactérias láticas.

Na maioria das fermentações espontâneas de frutas e vegetais, a matéria-prima não é submetida ao tratamento térmico, já que o processo fermentativo depende da microbiota de ocorrência natural destes, no entanto, dada a diversidade dos micro-organismos na matéria-prima, poderá haver uma falta de controle, resultando em produtos finais indesejáveis. Na tentativa de elaborar um produto por um método mais seguro, antes da fermentação os vegetais foram submetidos ao processo de branqueamento (85°C/2min) e resfriados, para facilitar a incorporação da solução no vegetal aumentando a disponibilidade de nutrientes, inativar as enzimas e eliminar o ar contido nos tecidos vegetais, e possivelmente este tratamento influenciou negativamente na proliferação das espécies de bactérias láticas e o processo de fermentação espontâneo foi dominado pelos micro-organismos mesófilos que melhor se adaptaram as condições fornecidas. Na literatura consultada, dados sobre o efeito do branqueamento na fermentação espontânea são inexistentes.

A suplementação de nutrientes como fonte de energia é essencial para assegurar o crescimento microbiano adequado. As pimentas contêm cerca de 10-15% de açúcares, sendo frutose (~10% de matéria seca) e glicose (~7% de matéria seca), os principais constituintes, e estas concentrações de substratos são suficientes para o crescimento microbiano (CHO *et al.*, 2015). Considerando o resultado de carboidratos do estudo, a pimenta de cheiro verde apresentou um valor médio de 6,51% em base úmida, mas, apesar deste valor ser semelhante à faixa de carboidratos dos vegetais mais usados em fermentações láticas, este valor provavelmente foi insuficiente para iniciar o processo fermentativo, agregado aos fatores citados. Ainda pode-se ressaltar que a quantificação de carboidratos do vegetal foi realizada incluindo a quantidade de fibras e carboidratos complexos como, por exemplo, a celulose, substratos que não são utilizados por bactérias láticas para fermentar o meio.

A adição de glicose na fermentação espontânea e na adicionada de culturas starters, para produção de ácido pelas bactérias láticas, vem sendo utilizada como fonte de carboidrato para assegurar o curso das fermentações de vegetais, como na produção de pimentões, azeitonas de mesa, couve-flor e misturas de vegetais (couve-flor, tomate verde e cenoura) (PERRICONE *et al.*, 2010; ALBERT; PERERA; ARENA, 2013; WOUTERS *et al.*, 2013; LEVENTDURUR *et al.*, 2016). Por exemplo, para as fermentações naturais de azeitonas pretas em diferentes salmouras (8% NaCl, 10% NaCl, 8% NaCl + 0,5% Glicose) cultivadas em três distritos da região da Turquia, Leventdurur *et al.* (2016) observaram que os valores finais de pH da salmoura suplementada com glicose foram menores aos da salmoura a 8% sem glicose nos três distritos, entretanto, maiores contagens de leveduras, ao final da fermentação, foram verificadas na salmoura com 0,5% de glicose em dois distritos. Sendo

assim, a adição de pequenas quantidades de glicose na fermentação da pimenta de cheiro poderá promover o crescimento da flora lática.

Com base nos fatores que provavelmente afetaram o curso correto das fermentações da pimenta de cheiro, para avaliação geral, o processo fermentativo foi realizado com os vegetais não submetidos ao processo de branqueamento e adição de glicose a 0,5%. Observaram-se diferenças importantes no processo de transferência de massa entre a pimenta submetida ou não ao branqueamento durante a fermentação, uma vez que, o processo fermentativo realizado com a matéria-prima não submetida ao processo de branqueamento, resultou na diminuição do pH, apresentando valores de pH final de 3,5, aumento da acidez (0,15%) e crescimento das bactérias láticas (6,92 Log UFC/mL). Mas, no que se referem à composição microbiana deteriorante, as bactérias mesófilas (7,07 Log UFC/mL) apresentaram crescimento semelhante à fermentação com os vegetais submetidos ao branqueamento em todos os níveis de sal (7,01, 6,88, 6,87 Log UFC/mL em 2, 3 e 4% NaCl, respectivamente).

Wouters *et al.* (2013) compararam as fermentações espontâneas e controladas com inoculo de *L. plantarum* IMDO 788 (concentração do inoculo de 6,0 Log UFC/mL) em vegetais mistos (couve-flor, cenoura e tomate verde) e puros (couve-flor). Neste estudo, as fermentações espontâneas apresentaram maior queda de pH nos primeiros dois dias, enquanto, nas fermentações controladas, o pH diminuiu rapidamente durante um dia de incubação. Uma sucessão de micro-organismos ocorreu durante as fermentações espontâneas, onde as espécies de bactérias láticas prevaleceram, ocorrendo maior acidificação após 3 dias de fermentação, resultando em valores de pH final de 3,5, na fermentação do couve-flor, e de 3,16, com os vegetais mistos.

O crescimento de mesófilos, fungos filamentosos e leveduras são considerados micro-organismos indesejáveis no processo. Contudo, em um estudo realizado por Xiong *et al.* (2016), verificou-se que a reprodução de fungos e *Escherichia coli* foram eficazmente inibidos ao final da fermentação (168h) do chucrute em todos os níveis de sal (2, 5 e 8%, p/v) devido ao efeito combinado do pH da salmoura, bactérias láticas, acidez elevada, ambiente anaeróbico e concentração de sal. Tassou, Panagou e Katsabokakis (2002), avaliando o desenvolvimento microbiológico da fermentação natural de azeitonas pretas em 18°C, 25°C e à temperatura ambiente, em diferentes salmouras (4, 6 e 8%, p/v), relataram a presença de leveduras durante a fermentação em todos os tratamentos, com aumento de 2-3 unidades logarítmicas no início do processo de fermentação, permanecendo inalterada posteriormente.

Com o propósito de produzir picles de pimenta com características probióticas a partir da fermentação lática, verificou-se que o número de bactérias láticas na pimenta de cheiro

fermentada espontaneamente, não submetida ao branqueamento, foram inferiores a 10^6 UFC/g. Este estudo demonstrou que a produção de pimentas fermentadas desta forma é inviável na obtenção de alimentos com características probióticas, já que a atividade das bactérias láticas deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g, mas, a qualidade organoléptica do vegetal fermentado foi mantida.

5.5 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE PIMENTA DE CHEIRO COM *L. plantarum*

A utilização de culturas starters de bactérias láticas para a produção de legumes e frutos fermentados tem sido recomendada, pois não só são capazes de acelerar e controlar o processo de fermentação, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e de deterioração, mas também contribui na segurança alimentar, nas características organolépticas como textura, cor e sabor do produto final e prolongamento da vida útil, que é especialmente importante na produção em escala industrial (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; PIASECKA-JOZWIAK *et al.*, 2013; WOUTERS *et al.*, 2013; RANDAZZO *et al.*, 2017). Muitas dessas bactérias exercem até mesmo características probióticas (BEGANOVIC *et al.*, 2014). A utilização de estirpes selecionadas para a fermentação das pimentas ainda é pouco relatada pelos pesquisadores.

No presente estudo, o uso de *L. plantarum* R1012 foi proposto na fermentação da pimenta de cheiro para produção de picles, a partir da avaliação da influência de diferentes condições de salmoura, variando as concentrações de glicose e NaCl, nos perfis de fermentação. Estudos preliminares da fermentação controlada sem suplementação de glicose resultaram em produtos deteriorados, uma vez que, a falta deste substrato estimulou a prevalência de micro-organismos típicos de *Bacillus* sp, consequentemente, a sua adição no meio foi essencial na condução do processo fermentativo e por isso, as concentrações necessárias de glicose foram investigadas. O crescimento máximo da cepa inicial na fermentação foi superior com 1 e 2% de glicose do que em 0,5% (Figura 13B), no entanto, o número de células viáveis não exibiu aumento proporcional a concentração de glicose. Alberto, Perera e Arena (2013) também demonstraram que o crescimento máximo de diferentes micro-organismos inoculados na fermentação do pimentão a diferentes temperaturas (22 e 30°C) com 2% de glicose obteve desenvolvimento superior do que a 0,2%, entretanto, não houve crescimento significativo apesar da concentração de glicose ser 10x mais elevada.

A inoculação de *L. plantarum* R1012 sobre a influência de diferentes concentrações de sal combinada a pequenas quantidades de glicose (0,5%), demonstrado na Figura 14B, apresentaram crescimento reduzido nas condições de stress do ambiente de salmoura. Observou-se que as contagens de bactérias láticas apresentaram comportamento semelhante de sobrevivência a 4, 5 e 6% NaCl durante o processo fermentativo. O aumento da viabilidade, a partir do inoculo inicial (6,5 Log UFC/mL), não foi de ~1 ciclo logarítmico no ponto de desenvolvimento máximo da cultura, às 12h de incubação. Contudo, em 6% de NaCl, as contagens de células foram mais elevadas.

A perda da viabilidade celular da cultura starter adicionada em ambas às condições de salmoura (isto é, concentração de glicose e sal avaliada) após a fase exponencial, pode ser devido à limitação do substrato ou inibição do ácido lático (PASSOS *et al.*, 1994) ou diferenças de temperatura entre a ativação da cepa (35°C) e o processo fermentativo (20°C). No que se refere à evolução dos fungos filamentosos e leveduras, a adição de cultura starter dominou as amostras de salmoura e um menor nível de bactérias deteriorantes foi detectado, independentemente das concentrações de glicose e NaCl na salmoura (Tabelas 6 e 7). A inter-relação entre as populações de bactérias láticas e leveduras desempenha um papel importante nos processos fermentativos, pois nesses ecossistemas eles podem competir pelos mesmos substratos ou promover sinergicamente o crescimento uns dos outros (BONATSOU *et al.*, 2017).

Randazzo *et al.* (2017) relataram resultados semelhantes para as azeitonas pertencentes à cultivar Nocellara Etnea, sob fermentação controlada em comparação a espontânea. No final do processo, todas as amostras de salmoura (8% NaCl) inoculadas apresentaram alto nível de *L. plantarum* e redução do crescimento de Enterobacteriaceae, envolvidos no processo de deterioração da azeitona, em comparação as amostras de controle. Também revelaram a predominância de *L. plantarum* no final de amostras inoculadas e não inoculadas a partir do estudo com culturas bacterianas simples e misturadas.

Um dos fatores físico-químicos de grande importância para o crescimento dos micro-organismos e para a qualidade do produto final é o valor de pH. O pH indica o progresso de uma fermentação, e sua queda ocorre devido a produção de ácido lático, causado pelo metabolismo das bactérias láticas (XIONG *et al.*, 2016). Segundo Hutkins (2006), apesar das bactérias produtoras de ácido lático serem consideradas ácido tolerantes, a maioria das espécies crescem melhor a níveis de pH inicial acima de 6,0. Quando inoculadas em um meio a um pH de 5,0 ou abaixo, mesmo em um curto período de tempo, perdem viabilidade e o seu crescimento se dará de forma lenta.

Avaliando os valores iniciais de pH do estudo em diferentes níveis de glicose e sal, Figuras 13B e 14B, respectivamente, observou-se que a adição da cultura bacteriana na salmoura foi realizada a um valor médio de pH de 5,7, este valor, apesar de não ser tão abaixo do recomendado, provavelmente pode ter influenciado o crescimento da cepa inicial, já que as contagens bacterianas não atingiram valores elevados durante a fermentação. Na fermentação controlada do pimentão, as culturas starters foram adicionadas em salmoura (4% NaCl + 2 ou 0,2% glicose) com pH inicial de 5 e o crescimento bacteriano apresentou bons resultados (ALBERTO; PERERA; ARENA, 2013) em discordância aos resultados do presente estudo.

Apesar da susceptibilidade do crescimento de *L. plantarum* R1012 atribuída ao valor inicial de pH da salmoura, a diminuição do pH final para um valor abaixo de 4,5 foi alcançado, após 72h de fermentação, independente das concentrações de glicose e sal, assegurando segurança microbiológica para a qualidade do produto final. Mas, este valor seguro de pH alcançado não coincidiu com o tempo em que as bactérias láticas atingiram sua população máxima.

A produção de azeitonas de mesa da variedade “Bella di Cerignola” por fermentação controlada com inoculo de *L. plantarum* e adição de glicose (0,5%), em comparação com a fermentação espontânea, ambos em 8 e 10% de NaCl, foram investigadas por Perricone *et al.* (2010). Neste estudo, os valores de pH das salmouras, após 49 dias de fermentação, foram de 4,70, nas amostras com cultura starter em ambas concentrações de NaCl, 4,39 e 4,30, nas amostras com inoculo e glicose a 8% e 10% de NaCl, respectivamente, enquanto que nas amostras controle o pH final foi de aproximadamente 5. Os autores concluíram que a combinação de culturas starters e pequenas quantidades de glicose (0,5%), é uma forma promissora para o desenvolvimento do processo fermentativo por assegurar a diminuição do pH até um valor seguro (4,3 a 4,5).

Curk, Hubert e Bringel (1996) avaliaram as características fisiológicas e bioquímicas de linhagens de *L. paraplanatum*, *L. plantarum* e *L. pentosus*, e observaram que nenhuma das cepas cresceram a 10% NaCl, a pH 4 e a 45°C. As cepas de *L. plantarum* ATCC 14917, assim como as demais linhagens do estudo, exibiram crescimento em MRS contendo 4, 6 e 8% NaCl, a pH 5 e 7, a temperatura de 15, 30 e 37°C, e não há produção de gás a partir da glicose.

Atualmente, os alimentos fermentados de origem vegetal vêm sendo utilizados como vetores para a incorporação de culturas probióticas (RANDAZZO *et al.*, 2014). As frutas e os vegetais constituem ecossistemas que podem abrigar estirpes funcionais, pois possuem características químicas e físicas que imitam as condições do trato gastrointestinal humano

(DI CAGNO *et al.*, 2013). As populações de bactérias foram e vêm sendo investigadas quanto ao seu potencial probiótico, uma vez que, quando administradas em quantidades adequadas e vivas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os benefícios para a saúde pretendidos dos probióticos só podem ser obtidos a depender da estirpe ou espécie específica, da dose e da viabilidade das bactérias ingeridas (FAO/WHO, 2002; TRIPATHI; GIRI, 2014; HUANG *et al.*, 2017), tais benefícios têm de ser demonstrados através das abordagens *in vitro* e *in vivo*, como, por exemplo, apresentar resistência às condições adversas que simulam as condições do trato gastrointestinal (GRIMOUD *et al.*, 2010; ŠEME *et al.*, 2017).

A avaliação de sobrevivência *in vitro* da estirpe *L. plantarum* R1012 utilizada nos ensaios fermentativos do presente estudo em condições similares às condições gastrointestinais foi investigada por Grimoud *et al.* (2010), e os resultados mostraram que a estirpe apresentou elevada taxa de sobrevivência. A partir das características da estirpe utilizada como cultura starter e das altas contagens de células viáveis na matriz da pimenta ao final da fermentação, independentemente do baixo nível de micro-organismo na salmoura em diferentes concentrações de glicose e NaCl, pode-se concluir que a partir dos ensaios iniciais para o desenvolvimento da formulação que apresente melhor viabilidade, o esboço dos produtos formulados pode ser considerado probiótico, pois o consumo direto dos vegetais é o que vai ser consumido da formulação. É interessante ressaltar que, no final do processo fermentativo, as pimentas fermentadas apresentaram resultados superiores a 9 Log UFC/mL de bactérias láticas, o que corresponde a uma quantidade mínima viável para os probióticos exigido pela legislação vigente (BRASIL, 1999).

Um número crescente de estudos sobre a utilização de culturas starters de bactérias láticas, comerciais ou isoladas das fermentações espontâneas, com características probióticas para a produção dos produtos hortícolas fermentados vem sendo investigada pelos autores, tais como na fermentação das azeitonas (BLANA *et al.*, 2014; RANDAZZO *et al.*, 2014) e do chucrute (BEGANOVIC *et al.*, 2014).

Apesar do processo fermentativo da pimenta por *L. plantarum* a diferentes condições de substrato e NaCl não apresentar diferenças estatisticamente significativas quanto ao parâmetro de pH e viabilidade microbiológica, os ensaios a 6% de NaCl com adição de 2% de glicose foi sugerido para elaboração do produto final, já que esta concentração de sal contribuiu para o atributo sabor característico da pimenta fermentada. Segundo Johanningsmeier *et al.* (2012), no estudo dos efeitos combinados de NaCl (0, 2, 4 e 6%) e pH (3,2, 3,8, 4,3 e 5) na deterioração do pepino fermentado, somente a 6% de NaCl e pH 3,2, a

degradação anaeróbica do ácido lático foi completamente prevenida após incubação prolongada.

Nilchian *et al.* (2016) ao avaliarem o uso de diferentes culturas starters (*L. plantarum*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*) em salmoura (4 e 6% de NaCl e 0,2 e 0,4% de inulina, p/v) a pH 4, para melhorar o processo de fermentação do pepino com alta qualidade, observaram que a textura dos pepinos fermentados a 6% de NaCl apresentaram maior dureza do que a 4% de NaCl, quanto ao número das estirpes de bactérias láticas, a 4% de NaCl e a 0,4% de inulina obteve-se maior crescimento, enquanto que a 6% de NaCl e 0,4% de inulina, menores números de mesófilos aeróbios e leveduras foram registrados no sexto dia.

A adição de sal é um dos pontos críticos da fermentação, pois influencia o tipo e a extensão do crescimento microbiano e as propriedades sensoriais do produto final (PEÑAS *et al.*, 2010), bem como as concentrações de glicose, pH e temperatura. A população de bactérias láticas na salmoura nos perfis iniciais de fermentação da pimenta de cheiro apresentou números abaixo do esperado (Figuras 13B e 14B), e como estes crescem melhor a níveis de pH inicial acima de 6,0, o ajuste do pH inicial para 6,5 foi realizado na salmoura, assim como maiores concentrações de substrato (2% de glicose) e mudança da temperatura de ativação da cultura starter para 20°C, na tentativa de conduzir o processo fermentativo em melhores condições de viabilidade celular para produção do produto final. Mas, baixas contagens de bactérias láticas foram observadas na salmoura (Figura 15), o que provavelmente deve-se à passagem de bactérias láticas da salmoura para o vegetal durante o processo fermentativo.

Como resultado da fermentação da pimenta de cheiro produzida de acordo com as condições de teste final, no final do processo observou-se declínio de pH (3,99), aumento de acidez (0,18%), domínio das bactérias láticas em relação aos fungos filamentosos e leveduras na salmoura e altos níveis de bactérias láticas na pimenta (9,28 Log UFC/mL), preservando as características sensoriais típicas dos processos fermentativos.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL

A capacidade das bactérias láticas em colonizar a matriz da pimenta de cheiro durante a fermentação fornece uma base útil para o uso de pimentas como vetores na incorporação de micro-organismos probióticos. Durante os processos fermentativos foi relatado o papel dominante das bactérias láticas na pimenta fermentada, apresentando altos níveis, e no estudo de compreensão da sequência de crescimento desta espécie no vegetal fermentado (Figuras

17A e 17B), observou-se um perfil microbiano distinto ao da salmoura. Após 18h de fermentação, o crescimento das bactérias láticas foi maior na pimenta do que na salmoura, devido principalmente à melhor adaptação às condições intrínsecas do vegetal.

As diferenças no pH e na acidez titulável, da pimenta e da salmoura, foi significativo. Estes valores, ao final da fermentação, não atingiram o equilíbrio, isto pode ser atribuído à fermentação com as pimentas inteiras, mas os resultados de pH em ambos são próximos e seguros. O valor final de pH da salmoura e da pimenta foi de 4,10 e 3,91, respectivamente, enquanto que a acidez titulável aumentou para 0,23% e 0,67% (Figura 17A), respectivamente. Os baixos valores da acidez titulável expressos em percentual de ácido láctico da salmoura, ao final do processo (72h), em comparação ao da pimenta, são próximos aos resultados de acidez titulável (0,3%) no 3º dia de fermentação espontânea do chucrute em salmoura contendo 6% de NaCl, 2% de açúcar cristal e especiarias, apresentados por Xiong *et al.* (2012).

Paramithiotis, Hondrodimou e Drosinos (2010) compararam as características físicas e químicas e microbiológicas na salmoura e no couve-flor durante a fermentação espontânea do vegetal. Neste estudo, ao final da fermentação (26 dias), o pH da salmoura e da couve-flor foi de 3,78 e 3,82, e acidez titulável de 0,65% e 0,67%, respectivamente. Quanto às análises microbiológicas, o crescimento dos micro-organismos na salmoura e no couve-flor apresentaram semelhança. A população de fungos filamentosos e leveduras foi estável ao longo do período de fermentação, em consonância ao estudo atual. Os autores concluíram que o processo fermentativo espontâneo foi dominado pelo crescimento das bactérias láticas, mesmo em elevada concentração de NaCl (8%).

O uso de *L. plantarum* R1012 como cultura starter e as condições de processo aplicadas (temperatura, concentração de glicose e NaCl, etc.) na fermentação em estudo, permitiu reduzir o tempo fermentativo. Em apenas 72h, a diminuição do pH e a acidificação da salmoura para valores desejáveis foram alcançados, o que é benéfico para a qualidade do produto final (WOUTERS *et al.* 2013) e para a produção em escala industrial, pois o processo fermentativo será realizado em menor tempo. Isto também foi demonstrado no estudo do comportamento das bactérias láticas (*L. plantarum* C3, *L. casei* A4 e *L. delbrueckii* D7) na fermentação do suco de repolho probiótico, relatado por Yoon, Woodams e Hang (2006) e similar ao processo do chucrute fermentado por *Leuconostoc mesenteroides* NCU1426 e *L. plantarum* NCU1121 por apenas 7 dias, relatado por Xiong *et al.* (2014).

5.7 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA PIMENTA FERMENTADA COM *L. plantarum* SOB REFRIGERAÇÃO

A estabilidade físico-química durante o armazenamento refrigerado é desejável, pois conferem aos produtos semelhança aos fabricados recentemente (PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011), assim como a estabilidade microbiológica, principalmente dos produtos com características probióticas.

Em relação as características físico-químicas, houve diminuição do pH e aumento da acidez titulável, tanto na salmoura como no vegetal, nos 32 dias de armazenamento. Isto pode ser atribuído ao consumo dos açúcares presentes pelos micro-organismos probióticos e, como consequência, houve produção de pequenas quantidades de ácidos orgânicos (PIMENTEL *et al.*, 2015). Elevada taxa de sobrevivência das bactérias láticas no vegetal foram observadas em comparação a salmoura, durante todo período de armazenamento, e nos primeiros 7 dias, a pimenta exibiu viabilidade microbiana maior que 10 Log UFC/mL e, em seguida, diminui para um nível aceitável em concordância a quantidade recomendada pela legislação. A estabilidade das bactérias láticas nas condições de armazenamento superou as populações de fungos filamentosos e leveduras que diminuíram com o tempo, na salmoura e no vegetal. Os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com outros estudos (YOON; WOODAMS; HANG, 2005; VALERO-CASES; FRUTOS, 2017), que também demonstraram a perda gradual de viabilidade durante o armazenamento, mas contagens de bactérias láticas dentro do limite exigido pela legislação.

Costa *et al.* (2013) estudaram a viabilidade microbiológica do suco de abacaxi fermentado com a cepa probiótica de *L. casei* durante o armazenamento refrigerado a 4°C por 42 dias. Neste estudo, após a fermentação, as amostras foram divididas em duas porções e uma desta foi adoçada com 10% de açúcar. A viabilidade microbiana das amostras adoçadas apresentaram maiores perdas, devido aos valores de pH mais baixos, e vida de prateleira mais curta, já que as contagens de bactérias láticas foram mantidas acima de 6 Log UFC/mL até o 28º dia. Entretanto, o suco não adoçado apresentou viabilidade microbiana superior a 6 Log UFC/mL durante todo o período de armazenamento (42 dias).

Yoon, Woodams e Hang (2006) avaliaram a viabilidade do *L. plantarum* C3, *L. casei* A4 e *L. delbrueckii* D7 em suco de repolho fermentado a 30°C por 72h durante o armazenamento refrigerado e constataram que a viabilidade microbiana foi reduzida quando armazenados a 4°C, mas permaneceram em contagens elevadas de células viáveis, exceto nas

amostras com *L. casei* A4 que perderem completamente a viabilidade após 2 semanas de armazenamento.

A manutenção da viabilidade da cultura probiótica na pimenta ($>10^7$ UFC/mL) durante a vida de prateleira nas condições de tolerância ácida do vegetal, indica a capacidade do *L. plantarum* em sobreviver as matrizes vegetais. A viabilidade é essencial para um produto funcional (COSTA *et al.*, 2013), principalmente durante o armazenamento do produto. Contagens acima de 10^6 UFC/mL são considerados valores potencialmente funcionais para probióticos (PIMENTEL *et al.*, 2015), portanto, o picles de pimenta fermentado com *L. plantarum* R1012 pode ser considerado probiótico, devido as elevadas contagens de bactérias lácticas após os 32 dias de armazenamento.

6 CONCLUSÃO

A partir da pimenta de cheiro foi possível produzir picles probióticos com a incorporação de *L. plantarum* R1012, demonstrando ser um bom substrato para o crescimento desta bactéria num processo fermentativo destinado a população em geral, principalmente, as pessoas intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite, hipercolesterolêmicas e vegetarianos.

Os melhores resultados para a fermentação da pimenta com a cepa probiótica foram a 2% de glicose, 6% de NaCl, pH 6,5 e inoculo de 6,5 Log UFC/mL por 72h. No entanto, ainda são necessários novos estudos de ajuste de formulação a fim de maximizar o crescimento das bactérias láticas na salmoura e avaliação de aceitação sensorial do produto.

A elaboração tecnológica do picles de pimenta com cultura probiótica demonstrou-se possível, considerando os níveis e a viabilidade das bactérias láticas no vegetal fermentado, durante o período de armazenamento sob refrigeração a 4°C, atendendo os limites mínimos recomendados pela legislação, e um produto desta natureza ainda não está comercialmente disponível no mercado nacional.

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, M.R.; PERERA, M.F.; ARENA, M.E. Lactic Acid Fermentation of Peppers **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 47-55, 2013.
- ALMEIDA, C.P.; ROCHA, J.C.; CARITA, J.S.; SOUZA, P.V.S. Biotecnologia na produção de alimentos. **Dossiê técnico**, 2011. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTY3Ng==>>. Acesso em: 02 jan. 2012.
- ANJO, D.L.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- ANTUNES, M.A.; VANZELA, E.S.L.; CHAVES, J.B.P.; RAMOS, A.M.; STRINGHETA, P.C.; FERNANDES, P.E. Controle de qualidade de produtos à base de pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 267, p. 41-51, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/122697>>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y; ROBINSON, R.K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**, v.15, p. 1184-1190, 2005.
- BARBOSA, R.I.; LUZ, F.J.F.; NASCIMENTO FILHO, H.R.; MADURO, C.B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira. I. Espécies Domesticadas. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 2, p. 177-192. 2002.
- BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÉAS, J.A.G. Mecanismo de ação dos compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.53, n.5, p.646-656, 2009.
- BEGANOVIC, J.; KOS, B.; PAVUNC, A. L.; UROI, K.; JOKIC, M.; SUSKOVIC, J. Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. **Microbiological Research**, v. 169, p. 623-632, 2014.
- BERNARDI, S.; GOLINELI, B.B.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Revisão: Aspectos da aplicação de culturas *starter* na produção de embutidos cárneos fermentados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 2, p. 133-140, 2010.
- BERNARDO, C.O.; MARTINS, I.B.A.; PINTO, C.M.F.; PINTO, C. L. O.; BITTENCOURT, F.; MARTINS, M.L.; MARTINS, E.M.F. Desenvolvimento de extrato de pimenta biquinho como forma de conservação pós-colheita. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.5, n.2, p. 29-37, 2015.
- BLANA, V.A.; GROUNTA, A.; TASSOU, C.C.; NYCHAS, G.E.; PANAGOU, E.Z. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. **Food Microbiology**, v. 38, p. 208-218, 2014.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BONATSOU, S.; ILIOPOULOS, V.; MALLOUCHOS, A.; GOGOU, E.; OIKONOMOPOULOU, V. KROKIDA, M.; TAOUKIS, P.; PANAGOU, P. Effect of osmotic dehydration of olives as pre-fermentation treatment and partial substitution of sodium chloride by monosodium glutamate in the fermentation profile of Kalamata natural black olives. **Food Microbiology**, v. 63, p. 72-83, 2017.

BORGES, K.M.; VILARINHO, L.B. O.; MELO FILLHO, A.A.; MORAIS, B.S.; RODRIGUES, R.N.S. Caracterização morfoagronômica e físico-química de pimentas em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 9, n. 3, p. 292-299, 2015.

BRAGA, T.R.; PEREIRA, R.C.A.; SILVEIRA, M.R.S.; SILVA, L.R.; OLIVEIRA, M.M.T. Physical-chemistry characterization of chili peppers (*Capsicum frutescens* L.) **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 112, n. 1, p. 6-10, 2013.

BRAMLEY, P.M. Is lycopene beneficial to human health?. **Phytochemistry**, v. 54, p. 233-236, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Em VISALEGIS: **Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999a. Publicado no Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília (DF): 1999.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.57, n.4, 2007.

CARBONERA, N.; SANTO, M.L.P.E. Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (Engraulis anchoita) fermentada. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)** [online], v.69, n.2, p. 201-207, 2010.

CARVALHO, A.V.; MATTIETTO, R.A.; RIOS, A.O.; MORESCO, K.S. Mudanças nos compostos bioativos e atividade oxidante de pimentas da região amazônica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 4, p. 399-408, 2014.

CARVALHO, C.L.M. **Avaliação de métodos de extração de carotenoides de pimenta (*Capsicum chinense*)**. 2014. 77 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

CASTRO-CONCHA, L.A.; CANCHE-CHUC, I.; MIRANDA-HAM, M.L. Determination of Antioxidants in Fruit Tissues from Three Accessions of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, n. 1, p. 15-18, 2012.

CERQUEIRA, A.P. **Conservação pós-colheita de pimentas-de-cheiro (*Capsicum chinense*) armazenadas sob atmosfera modificada e refrigeração**. 2012. 80 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

CERQUEIRA, D.A.; TESHIMA, E. Avaliação do crescimento de bactérias láticas com substrato prebiótico. In: XV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, p. 543-546, 2011. Feira de Santana, **Resumos...** Universidade Estadual de Feira de Santana. Disponível em: <http://www2.uefs.br/seminar/upload/2011/2011XV-015DIL819-080.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2016.

CHO, S.; KIM, J.-M.; YU, M.-S.; YEON, S.-J.; LEE, C.-H.; KIM, S.-K. Fermentation of hot pepper juice by *Bacillus licheniformis* to reduce pungency. **Journal of the Korean Society Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 611-616, 2015.

CONFORTI, F.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1096-1104, 2007.

COSTA, M.G.M.; FONTELES, T.V.; DE JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 261-266, 2013.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. In: **Alimentos funcionais: Histórico, Conceitos e Atributos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010, 536 p.

COSTA, L.V.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; ALVES, S.R.M. Polinização e fixação de frutos em *Capsicum chinense* Jacq. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 2, p. 361-364, 2008.

CURK, M.-C.; HUBERT, J.-C.; BRINGEL, F. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 595-598, 1996.

DAMBROS, J.I. **Estabilidade de compostos potencialmente bioativos e alterações de qualidade em frutos e produtos de pimenta (*Capsicum spp.*)**. 2014. 82 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

DEEPA, N., KAUR, C., BINOVY, G., BALRAJ, S., KAPOOR, H.C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p. 121-129, 2007.

DE VRIES, M.C.; VAUGHAN, E.E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract (Review). **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1018–1028, 2006.

DI CAGNO, R.; SURICO, R.F.; MINERVINI, G.; DE ANGELIS, M.; RIZZELLO,C.G.; GOBBETTI, M.. Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers (*Capsicum annum* L.) to be stored at room temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 108-116, 2009.

DI CAGNO, R.; CODA, R.; ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Review: Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, p. 1-10, 2013.

DOMENICO, C.I.; COUTINHO, J.P.; GODOY, H.T.; MELO, A.M.T. Caracterização agronômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 466-472, 2012.

DOMENICO, C.I. **Caracterização agronômica e pungência em pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2011. 48 p. Dissertação de mestrado, Instituto Agronômico, Campinas-SP.

DORANTES-ALVAREZ, L.; JARAMILLO-FLORES, E.; GONZÁLEZ, K.; MARTINEZ, R.; PARADA, L. Blanching peppers using microwaves. **Procedia Food Science**, v. 1, p.178-183, 2011.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 2002.

FELTRIN, V.P.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S.; TORRES, R.C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melão de cana-de-açúcar. **Brazilian archives biology technology**, v.43, n.1, 2000.

FERRANDO, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.; SUAREZ, V. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: a study in vitro of heat stress influence. **Food Microbiology**, v. 54, p. 154-161, 2016.

FERRANDO, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.; SUAREZ, V. Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food stress conditions. **Food Microbiology**, v. 48, p. 63-71, 2015.

FLORES, N.C.; VANLEEUWEN, D.; PENNOCK, R.D. The effect of calcium on microbial quality and consistency of chile pepper (*Capsicum annuum* cv. Mesilla Cayenne) mash during fermentation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p.1482-1487, 2007.

FRANCO, W.; PÉREZ-DÍAZ, I. M. Role of selected oxidative yeasts and bacteria in cucumber secondary fermentation associated with spoilage of the fermented fruit. **Food Microbiology**, v. 32, p. 338-344, 2012.

FURTADO, A.A.L.; DUTRA, A.S. Elaboração de molhos de pimentas. **Informe agropecuário**, v. 33, n. 267, p. 52-56, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67412/1/2012-105.pdf>>. Acesso em 17 fev. 2016.

GALLINA, D.A.; ANTUNES, A.E.C.; AZAMBUJA-FERREIRA, N.C.; MENDONÇA, J.B.; NORBONA, R.A. Caracterização de Bebida Obtida a Partir de Leite Fermentado Simbiótico Adicionado de Polpa de Goiaba e Avaliação da Viabilidade das Bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012.

GARCIA, R.V. **Desenvolvimento de leite de cabra fermentado adicionado de cepas probióticas, inulina, amido e gelatina**. 2011. 83f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba-PB.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Conservação de alimentos por fermentação.** Tecnologia de alimentos: Princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008. 377p.

GOLDONI, J.S.; GOLDONI, C.L. Fermentação láctica de hortaliças e azeitonas. In: AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial:** Biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 269-287.

GONZÁLEZ-QUIJANO, G.K.; DORANTES-ALVAREZ, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; JARAMILLO-FLORES, M.E.; PEREA-FLORES, M.J.; LEÓN, A.V.-P.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. Halotolerance and survival kinetics of lactic acid bacteria isolated from jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) fermentation. **Journal of food science**, v. 79, p. 1545-1553, 2014.

GRIMOUD, J.; DURAND, H.; COURTIN, C.; MONSAN, P.; OUARNÉ, F.; THEODOROU, V.; ROQUES, C. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. **Anaerobe**, v. 16, p. 493-500, 2010.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N.; SCANNELL, A.G.M. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 346-355, 2011.

HAMDI, M. New trends of table olive processing for quality control and functional properties. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of fermented functional foods:** Funcional foods and nutraceuticals, 2. ed., 2008, p. 413-427.

HARRIS, J.R. Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology. In: HARRIS, J.R., **Subcellular Biochemistry**. New York, 1996, p. 25.

HOLZAPFEL, W.; SCHILLINGER, U.; BUCKENHUSKES, H. In: _____. **Handbook of fermented functional foods:** Funcional foods and nutraceuticals, 2. ed., 2008, p. 395-410.

HUANG, S.; VIGNOLLES, M.-L.; CHEN, X.D.; LOIR, Y.L.; JAN, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1-17, 2017.

HUTKINS, R.W. **Microbiology and technology of fermented foods.** 1 ed. Blackwell Publishing, 2006. p. 473.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos.** 2. ed. Brasília: ANVISA, 1997. 371p.

JARAMILLO-FLORES, M.E.; DORANTES-ALVAREZ, L.; GARCÍA-BARRIENTOS, R.; WELTI-CHANES, J. Mexican Pickled Jalapeño Pepper. In: HUI, Y. H. **Handbook of fruit and vegetable flavors**, 2010, p. 949-962.

JARRET, R.L.; BERKE, T.; BALDWIN, E.A.; ANTONIOUS, G. Variability for free sugars and organic acids in *Capsicum Chinense*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, p 138-145, 2009.

JIN, Q.; LI, L.; MOON, J.S.; CHO, S.K.; KIM, Y.J.; LEE, S.J.; HAN, N.S. Reduction of D-lactate content in sauerkraut using starter cultures of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* expressing the *ldhL* gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p. 479-483, 2016.

JOHANNINGSMEIER, S. D.; FRANCO, W.; PEREZ-DIAZ, I.; MCFEETERS, R. F. Influence of Sodium Chloride, pH, and Lactic Acid Bacteria on Anaerobic Lactic Acid Utilization during Fermented Cucumber Spoilage. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. 397-404, 2012.

KEARNEY, N.; STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges Associated with the Development of Probiotic-Containing Functional Foods. In: _____. **Handbook of fermented functional foods: Funcional foods and nutraceuticals**, 2. ed., 2008, p. 26-55.

KOH, F.M. **Physicochemical properties of pepper mash fermented in wood and plastic**. 2005. 86 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Louisiana, Louisiana-EUA.

LETRA, J.F.; NOJIMA, M.A.; NOGUEIRA, I.B.R.; PEREIRA, E.S. Processamento de conservas e temperos. **Dossiê técnico**, 2007. Disponível em:<<http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTU=>>. Acesso em 20 jun. 2015.

LEVENTDURUR, S.; SERT-AYDIN, S.; BOYACI-GUNDUZ, C.P.; AGIRMAN, B.; GHORBAL, A.B.; FRANCESCA, N.; MARTORANA, A.; ERDEN, H. Yeast biota of naturally fermented black olives in different brines made from cv. Gemlik grown in various districts of the Cukurova region of Turkey. **Wiley Online Library**, v. 33, p. 289-301, 2016.

LIMA, A.S.; TRANCOSO, F.O.; MOURA, K.M.; ALMEIDA, L.B.; SILVA, T.N.S.; SOUZA, W.M.; MARCELLINI, P.S. Caracterização Centesimal de Maxixe e sua Aplicação na Produção de Picles. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.4, p. 407-412, 2006.

LIU, C.J.; WANG, R.; GONG, F.M.; LIU, X.F.; ZHENG, H.J.; LUO, Y.Y.; LI, X.R. Complete genome sequences and comparative genome analysis of *Lactobacillus plantarum* strain 5-2 isolated from fermented soybean. **Genomics**, v.106, p. 404-411, 2015.

LOIZZO, M.; PUGLIESE, A.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 623-631, 2015.

LOPES, C.A.; RIBEIRO, C.S.C.; CRUZ, D.M.R.; FRANÇA, F.H.; REIFSCHNEIDER, F.J. B.; HENZ, G.P.; SILVA, H.R.; PESSOA, H.S.; BIANETTI, L.B.; JUNQUEIRA N.V.; MAKISHIMA, N.; FONTES, R.R.; CARVALHO, S.I.C.; MARQUELLI, W.A.; PEREIRA, W. Sistema de produção. Pimenta (*Capsicum* spp.): Importância econômica, Botânica. **Embrapa Hortaliças**, 2007. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/importanciaeconomica.html> Acesso em 9/11/14.

MACEDO, G.A.; MACEDO, J.A.; FLEURI, L.F. Fermentation and Fruit Flavor Production In: _____. **Handbook of fruit and vegetable flavors**, 2010, p. 59-72.

MACHADO, A.D.O. Chucrute. **Dossiê técnico**, 2007. Disponível em: <<http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Nzg=>>>. Acesso 02 de fev 2016.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S.I.; AVILA, G.M. ; SAENZ, J.M.; AGUILAR, C.M.; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 365-373, 2011.

MATEOS, R.M.; LEÓN, A.M.; SANDALIO, L.M.; GÓMEZ, M.; DEL RÍO, L. A.; PALMA, J. M. Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum L.*): purification, characterization and antioxidant activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1507-1516, 2003.

MATEUS, T.; SANTO, D.; SAÚDE, C.; PIRES-CABRAL, P.; QUINTAS, C. The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. **International Journal of Food Microbiology**, v. 218, p. 57-65, 2016.

MOLIN, G. *Lactobacillus plantarum*: The role in foods and in human health. In: _____. **Handbook of fermented functional foods**: Funcional foods and nutraceuticals, 2. ed. 2008, p. 1-24.

MONTEIRO, E.R. **Identificação botânica e divergência genética em pimentas do gênero *capsicum* spp.** 2008. 66p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

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

MORAES, L.P.; PAZ, M.F.; ARGANDOÑA, E.J.S.; SILVA, L.R.; ZAGO, T.O. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de molho de pimenta “dedo-de-moça” fermentado. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 33-38, 2012.

MOREIRA, A.; TEIXEIRA, P.C.; ZANINETTI, R.A.; PLACIDO JUNIOR, C.G. **Fertilizantes e corretivo da acidez do solo em pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense*) cultivada no Estado do Amazonas** (1^a aproximação). Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 18 p., 2010. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47318/1/Doc-82.pdf>>. Acesso 03 out. 2015.

MÚJICA-PAZ, H.; ARGUELLES-PIÑA, L.D.; PÉREZ-VELÁZQUEZ, L.C.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; WELTI-CHANES, J. Vacuum pulse and brine composition effect on pickling kinetics of whole jalapeño pepper. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 195-202, 2006.

NAMIKI, M. **Antioxidants/antimutagenes in foods.** In: Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms. Springer US, New York, 1990, p. 273-300.

NILGHIAN, Z.; SHARIFAN, A.; RAHIMI, E.; ABADI, N. M. Improvement of Fermented Cucumber Characteristics by Starter Culture of *Lactobacillus plantarum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophiles*. **Journal of Food Biosciences and Technology**, v. 6, n. 2, p. 31-40, 2016.

OHARA, R.; PINTO, C.M.F. Mercado de pimentas processadas. **Informe Agropecuário**, v.33, n.267, p.7-13, 2012.

OLIVEIRA, A.M.C. **Caracterização Química, Avaliação da Atividade Antioxidante In Vitro e Atividade Antifúngica de Pimentas do Gênero Capsicum spp.** 2011. 82f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

PARAMITHIOTIS, S.; HONDRODIMOU, O. L.; DROSINOS, E. H.; Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. **Food Research International**, v. 43, p. 1098-1103, 2010.

PASSOS, F.V.; FLEMING, H.P.; OLLIS, D.F.; FELDER, R.M.; McFEETERS, R.F. Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 2627-2636, 1994.

PEÑAS, E.; FRIAS, J.; GOMEZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage. **Food Control**, v. 21, p. 524-528, 2010.

PEREIRA, A.P.; PEREIRA, J.A.; BENTO, A.; ESTEVINHO, M.L. Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. **Food and chemical toxicology**, v. 36, p. 2895-2902, 2008.

PERRICONE, M.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. Use of *Lactobacillus plantarum* and Glucose to Control the Fermentation of “Bella di Cerignola” Table Olives, a Traditional Variety of Apulian Region (Southern Italy). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 430-436, 2010.

PIASECKA-JOZWIAK, K.; ROZMIERSKA, J.; CHABLOWSKA, B.; STECKA, K.M.; SKAPSKA, S.; KLISZEZ, M.; SZKUDZINSKA-RZESZOWIAK, E. Starter Cultures for Lactic Acid Fermentation of Sweet Pepper, Pattypan Squash and Tomatoes. **Polish Journal of Food Nutrition Sciences**, v. 63, n. 2, p. 95-102, 2013.

PIMENTEL, T.C.; PRUDENCIO, S.H.; RODRIGUES, R.S. Néctar de pêssego potencialmente simbótico. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 3, p. 455-464, 2011.

PIMENTEL, T.C.; MADRONA, G.S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S.H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, p. 415-422, 2015.

PINTO, C.M.F.; PINTO, C.L.O.; DONZELES, S.M.L. Pimenta *Capsicum*: Propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.3, n.2, p.108-120, 2013.

PRAJAPATI, J.B.; NAIR, B.M. The history of fermented foods. In: _____. **Handbook of fermented functional foods:** Funcional foods and nutraceuticals, 2. ed. 2008, p 1-24.

RANDAZZO, C.L.; TODARO, A.; PINO, A.; PITINO, I.; CORONA, O.; MAZZAGLIA, A.; CAGGIA, C. Giarraffa and Grossa di Spagna naturally fermented table olives: Effect of starter and probiotic cultures on chemical, microbiological and sensory traits. **Food Research International**, v. 62, p. 1154-1164, 2014.

RANDAZZO, C.L.; TODARO, A.; PINO, A.; PITINO, I.; CORONA, O.; CAGGIA, C. Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of Nocellara Etnea table olives. **Food Microbiology**, v. 65, p. 136-148, 2017.

REBOUÇAS, T.N.H.; VALVERDE, R.M.V.; TEIXEIRA, H.L. Bromatologia da pimenta malagueta *in natura* e processada em conserva. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 163-165, 2013.

REINA, L.D.; PÉREZ-DIAZ, I.M.; BREIDT, F.; AZCARATE-PERIL, M. A.; MEDINA, E.; BUTZ, N. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation at 20 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 35-40, 2015.

REIFSCHEIDER, F.J.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 113p, 2000.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. S105-S110, 2002.

RODRIGUEZ, H.; CURIEL, J. A.; LANDETE, J. M.; RIVAS, B. FELIPE, F. L.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J. M.; MUÑOZ, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 79-90, 2009.

ROMERO-GIL, V.; GARCÍA-GARCÍA, P.; GARRIDO-FERNANDEZ, A.; ARROYO-LOPEZ, F.N.; Susceptibility and resistance of lactic acid bacteria and yeasts against preservatives with potential application in table olives. **Food Microbiology**, v. 54, p. 72-79, 2016.

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

SANTANA, L.R.R.; MATSUURA, F.C.A.U.; CARDOSO, R.L. Genótipos melhorados de mamão (*Carica papaya* L.): avaliação sensorial e físico-química dos frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 217-222, 2004.

SAVARD, T. Vegetables: Fermentation Applications. In: HELDMAN, D.R.; WHEELER, M.B; HOOVER, D.G. **Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food**, v. 21, p. 740, 2010.

ŠEME, H.; MATIJAŠIĆ, B. B.; ŠVIGELJ, K.; LANGERHOLC, T., FUJS, Š.; HORVAT, J.; ZLATIĆ, E.; GJURAČIĆ, K.; PETKOVIĆ, H.; ŠTEMPELJ, M.; KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOSEC, G. Generation of *Lactobacillus plantarum* strains with improved potential to target

gastrointestinal disorders related to sugar malabsorption. **Food Research International**, v. 94, p. 45-53, 2017.

SGANZERLA, M.; COUTINHO, J.P.; MELO, A.M.T.; GODOY, H.T. Fast method for capsaicinoids analysis from Capsicum chinense fruits. **Food Research International**, v. 64, p. 718-725, 2014.

SIEGRIST, M.; SHI, J.; GIUSTO, A.; HARTMANN, C. Worlds apart. Consumer acceptance of functional foods and beverages in Germany and China. **Appetite**, v. 92, p. 87-93, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Ed. Varela, 2010. 624p.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira Ciencias Farmacêutica**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SWAIN, M.R.; ANANDHARAJ, M.; RAY, R.C.; RANI, R.P. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. **Biotechnology Research International**, v. 2014, 19 p., 2014.

TASSOU, C.C.; PANAGOU, E.Z.; KATSABOXAKIS, K.Z. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. **Food Microbiology**, v. 19, p. 605-615, 2002.

TESHIMA, E. **Viabilidade de *Bifidobacterium longum* em leite fermentado com *Lactobacillus casei* suplementado com extrato de cenoura**. 1997. 56 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

VALDEZ-FRAGOSO, A.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S.I.; SALAIS-FIERRO, F.; WELTI-CHANES, J.; MUJICA-PAZ, H. Vacuum pulse-assisted pickling whole jalapeño pepper optimization. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1261-1268, 2007.

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M.J. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for Lactobacillus acidophilus: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 136-143, 2017.

WOUTERS, D.; GROSU-TUDOR, S.; ZAMFIR, M.; DE VUYST, L. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. **Journal Science Food and Agriculture**, v. 93, p. 3352-3361, 2013.

XIONG, T.; GUAN, Q.; SONG, S.; HAO, M.; XIE, M. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. **Food Control**, v. 26, p. 178-181, 2012.

XIONG, T.; LI, J.; LIANG, F.; WANG, Y.; GUAN, Q.; XIE, M. Effects of salt concentration on Chinense sauerkraut fermentation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 169-174, 2016.

XIONG, T.; PENG, F.; LIU, Y.; DENG, Y.; WANG, X.; XIE, M. Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p. 713-717, 2014.

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

YOON, Y. K.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p. 73-75, 2005.

ZAGO, M.A.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1033-1040, 2011.