

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**OBTENÇÃO DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS A BASE DE PECTINA
COMO VEÍCULO PARA MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E
APLICAÇÃO EM CENOURA E GOIABA MINIMAMENTE PROCESSADAS**

Marcela Zonta Rodrigues
Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

MARCELA ZONTA RODRIGUES

**OBTENÇÃO DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS A BASE DE PECTINA
COMO VEÍCULO PARA MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E
APLICAÇÃO EM CENOURA E GOIABA MINIMAMENTE PROCESSADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R696o
2017
Rodrigues, Marcela Zonta, 1988-

Obtenção de revestimentos comestíveis a base de pectina
como veículo para micro-organismos probióticos e aplicação em
cenoura e goiaba minimamente processadas / Marcela Zonta
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2017.

xvi, 100f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Afonso Mota Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Lactobacilos.
3. Micro-organismos. 4. Probióticos. 5. Microscopia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

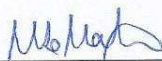
CDD 22 ed. 664

MARCELA ZONTA RODRIGUES

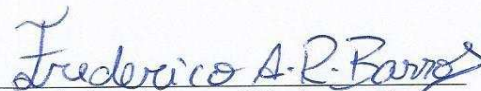
OBTENÇÃO DE REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS A BASE DE PECTINA
COMO VEÍCULO PARA MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E APLICAÇÃO
EM CENOURA E GOIABA MINIMAMENTE PROCESSADAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

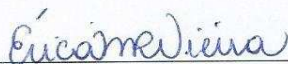
APROVADA: 06 de setembro de 2017.



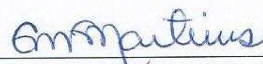
Maurilio Lopes Martins



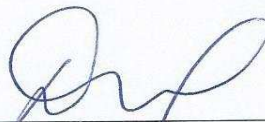
Frederico Augusto Ribeiro de Barros



Érica Nascif Rufino Vieira
(Coorientadora)



Eliane Maurício Furtado Martins
(Coorientadora)



Afonso Mota Ramos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Segundo o dicionário a palavra agradecimento significa mostrar ou manifestar gratidão, render graças, reconhecer. Um escritor anônimo disse que ‘a gratidão é a lembrança do coração’ e durante o percurso da minha vida vejo que essa frase faz todo sentido. Quero aqui expressar minha eterna gratidão por todos aqueles que de alguma forma estiveram comigo ao longo desses quatro anos em que cursei o doutorado e só de pensar em escrever os inúmeros agradecimentos as lágrimas já escorrem em meu rosto.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do curso de doutorado. Agradeço à Capes pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo recurso financeiro disponibilizado.

Hoje tenho a absoluta convicção que ao longo de nossa vida sempre aparecem anjos da guarda que nos ajudam e sem eles nossos objetivos muitas vezes não poderiam ser alcançados. Por isso essa parte da tese é tão especial e uma das mais difíceis de escrever. Eu tenho o orgulho e a felicidade de dizer que Deus colocou no meu caminho anjos sem asas mas sem sombra nenhuma de dúvida anjos e que sem eles eu não teria conseguido chegar até aqui. Tenham a certeza que cada um de vocês contribuíram e muito para que hoje eu chegasse onde cheguei e que vocês estarão sempre no meu coração. Posso sim dizer Mãe, Pai, Irmã, Irmão, Luiza, Gabriel, Thales, Leo, Bianca, Aline, Marcos, Adeline, Driene, Kéllen, Jefim e Flavinho que vocês são os anjos da guarda que me guiaram, me auxiliaram, me consolaram, me ajudaram e me trouxeram até aqui.

Alaíde, Robson, Ariadna, Lucas, Luiza e Gabriel vocês são a família que Deus me deu e que certamente eu escolheria para seguirem comigo se Deus já não tivesse feito isso por nós. Com todas as nossas diferenças a nossa união é a nossa principal virtude, quero dizer aqui Muito Obrigada por sempre terem sido abrigo para mim. Vocês sempre foram uma fonte inesgotável de alegria, de momentos inesquecíveis e de atenção. Tenho também que agradecer a todos os meus familiares por sempre estarem torcendo por mim. Amo muito vocês!

Thales muito obrigada pelo companheirismo, por ser essa pessoa tão carinhosa, por me escutar em dias tão difíceis, por sempre me dar força para permanecer firme e ir atrás do que eu sou capaz e por estar sempre perto de mim mesmo estando a quilômetros de distância. Tenha certeza que você faz parte desta conquista.

Adeline, Driene, Kéllen, Jefim, Flavinho, Bianca, Aline e Marcos vocês, cada um da sua maneira, foram muito mais que amigos, foram a família que aqui formei. Vocês foram meus companheiros de balada, de análises no laboratório e de dias que tinham horário para começar mas não para terminar. Vocês foram pessoas que ajudaram a tornar os meus dias melhores. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida e por estarem comigo em todos esses momentos que passaram e por todos que virão (não abro mão de vocês no meu futuro, quero para sempre).

Meu muito obrigada em especial a Aline, mais que amiga de laboratório uma irmã que escolhi na vida, que sempre esteve disposta a me ajudar mesmo depois que foi pra Fortaleza. Você foi parte essencial desse trabalho e da minha vida em Viçosa. Saiba que você faz muita falta aqui pertinho.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da UFV que me acompanharam durante o doutorado, meu muito obrigada por sempre passar seus conhecimentos e disponibilizar o uso dos laboratórios nos quais são responsáveis. Em especial ao Professor Afonso Mota Ramos que me orientou e sempre que pode atendeu aos meus pedidos, muito obrigada Professor pela excelente convivência e por todo o conhecimento repassado; à Professora Érica Nascif Rufino Vieira que chegou e logo nos conquistou com todo o seu carisma, gostaria de reforçar a você Érica a minha gratidão por sempre me receber e atender com tanta disponibilidade e carinho e, por pedir empréstimos no DTA inteiro para que meu projeto fosse finalizado; à Professora Eliane Maurício Furtado Martins que me acompanha desde a graduação sempre me auxiliando e repassando seus conhecimentos, sempre muito solicita em me atender e a sanar minhas inúmeras dúvidas; ao Professor Paulo César Stringheta meu agradecimento eterno pois todo encontro com o senhor é um imenso aprendizado e como o senhor mesmo diz eu me sinto uma agregada do seu laboratório e tenho muito orgulho de dizer que fiz um pouquinho de parte desta equipe. Aos professores que estão aqui comigo nessa etapa final Frederico Augusto Ribeiro de Barros e Maurilio Lopes Martins meu agradecimento a vocês é enorme não só por estarem fazendo parte desse dia mas também por todo o conhecimento repassado quando eu fiz estágio de ensino sendo uma aluna de doutorado ou quando eu era uma aluna de graduação.

Tenho muito que agradecer também aos técnicos do DTA em especial aos responsáveis pela planta piloto de processamento de frutas e hortaliças Elvécio, Zé Geraldo, Simeão e Célio. Com Elvécio e Zé Geraldo pude conviver por mais tempo e

tenham a certeza que cada dia de convivência foi um novo aprendizado além de sempre ser muito divertido. Onde eu for levarei o conhecimento adquirido com vocês e a certeza de que ali existe mais do que uma relação profissional existe uma amizade. Tenham certeza que eu não teria conseguido chegar até aqui se eu não tivesse tido todo o auxílio de vocês.

Amigos dos laboratórios de Frutas e Hortaliças (Aline, Ariana, Bianca, Bruna, Camila, Carolina, Daniele, Jamile, Marcos, Mariana, Mônica, Paloma e Patrícia), vocês caminharam comigo e passaram por diversos momentos comigo, muito obrigada por toda a caminhada. Aos amigos do laboratório de Pigmentos (Kéllen, Jefim, Thaís, Mariana, Juliana, Mariane, Amanda e Eliane) e Culturas Láticas (Driene, Viviane, Érica e Zequinha) meu muito obrigado pela ótima convivência e por toda a ajuda sempre e, também pela disponibilidade da utilização do espaço físico, de equipamentos e de material de consumo, sem todos os empréstimos e doações de vocês essa jornada teria sido muito mais complicada. As minhas estagiárias, Mariana e Camila, muito obrigada por estarem lá comigo mesmo naqueles dias tão frios em que tínhamos que passar cedinho ao lado da lagoa da UFV.

Agradeço também o Núcleo de Microscopia e Micro-análise da UFV, aqui representados por Gilmar, Carlota e Cristiane que nos auxiliaram na microscopia de varredura, pela excelente convivência e pela ajuda prestada, além da oportunidade de desenvolver parte desse trabalho. Agradeço ainda as agências financiadoras CNPq, Capes e Fapemig.

A Deus por último, mas acima de tudo e de todos, por ter me proporcionado a vida e a sabedoria, força e perseverança para vencer os obstáculos e pela presença insubstituível em cada instante da minha vida.

BIOGRAFIA

Marcela Zonta Rodrigues, filha de Robson Oliveira Rodrigues e Alaíde Erli Zonta Rodrigues, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais no dia 18 de setembro de 1988.

Em fevereiro de 2010, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, em Rio Pomba-MG. No período de 2009 a 2010 foi bolsista de iniciação científica e trabalhou com adição de antioxidantes em vegetais minimamente processados.

Em julho de 2013, concluiu o Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, onde continuou sua pesquisa na área de minimamente processados. Em agosto de 2013 ingressou no doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos nesta mesma instituição de ensino.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
1. REFERENCIAL TEÓRICO	4
1.1. Vegetais minimamente processados	4
1.2. Revestimentos Comestíveis	5
1.3. Probióticos	11
1.3.1. Gênero <i>Lactobacillus</i>	13
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	17
APÊNDICE	28
1. Delineamento experimental	28
2. Análise Estatística	29
CAPÍTULO 1: Digestão gastrointestinal simulada <i>in vitro</i> de revestimentos comestíveis a base de pectina contendo micro-organismos probióticos e avaliação da sua atividade frente a <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria innocua</i>	31
RESUMO	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 2: Adição de revestimento comestível contendo culturas probióticas em cenoura minimamente processada sem alteração das características microbiológica, físicas e químicas	51
RESUMO	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4. CONCLUSÃO	72
5. REFERÊNCIAS	73
CAPÍTULO 3: Revestimento comestível suplementado de culturas probióticas e adição em goiaba minimamente processada	75
RESUMO	75

1. INTRODUÇÃO	76
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4. CONCLUSÕES	96
5. REFERÊNCIAS.....	96
CONCLUSÃO GERAL.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da primeira etapa do experimento para avaliar os revestimentos comestíveis produzidos.	29
Figura 2 – Esquema do experimento para avaliar a atuação dos revestimentos comestíveis produzidos em vegetais minimamente processados(2ª etapa).	29

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Viabilidade de bactérias probióticas durante o período de estocagem (12 dias) dos diferentes revestimentos.	39
Figura 2 - Variação da contagem padrão em placas de células viáveis nos revestimentos RLA, RLPA e RLALPA ao longo do período de armazenamento refrigerado	40
Figura 3 - Contagem padrão em placas de células viáveis após simulação do trato gastrointestinal <i>in vitro</i> durante o período de estocagem de 12 dias para os diferentes revestimentos.....	41
Figura 4 - Variação do pH dos revestimentos RLP, RLPA, RLALP e RLPLPA armazenados por 12 dias a 4 °C	43
Figura 5 - Variação da viscosidade dos tratamentos RLP e RLPA ao longo do armazenamento a 4 °C por 12 dias.	45

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Variação da contagem padrão em placas de fungos filamentosos e leveduras (A) e de bactérias psicrotólicas (B) em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos ao longo do período de armazenamento refrigerado (4 °C).	62
Figura 2 - Variação da contagem padrão em placas de cenoura minimamente processadas revestidas ao longo do período de armazenamento a 4 °C	63
Figura 3 - Variação da contagem de células viáveis resistente as condições gastrointestinais simuladas em fatias de cenoura revestidas ao longo do período de armazenamento a 4 °C	64
Figura 4 – Comparação da contagem de células viáveis de bactérias probióticas antes e após a digestão <i>in vitro</i> em fatias de cenoura logo após a aplicação do revestimento comestível.	65

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de cenoura minimamente processada recobertas com revestimento de pectina de baixa metoxilação contendo micro-organismos probióticos ou não.	66
Figura 6 – Perda de massa (%) das cenouras minimamente processadas, revestidas ou não, ao longo de 12 dias a 4 °C	68
Figura 7 – Índice de Brancura das cenoura dos diferentes tratamentos durante a vida de prateleira sob refrigeração.	70

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Contagem de micro-organismos probióticos nas fatias de goiaba minimamente processada revestidas armazenadas por 10 dias a 4 °C	84
Figura 2 - Contagem de bactérias probióticas resistentes às condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i> ao longo do período de armazenamento a 4 °C	85
Figura 3 – Comparação da contagem padrão em placas de bactérias probióticas antes e após a simulação das condições gastrointestinais <i>in vitro</i> de goiaba minimamente processada logo após o processamento.	86
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de fatias de goiaba recobertas com revestimento de pectina de baixa metoxilação contendo bactérias probióticas ou não.	87
Figura 5 - Contagem de bactérias psicotróficas (A) e de fungos filamentosos e leveduras (B) de goiaba minimamente processada revestida ao longo do período de armazenamento a 4 °C.....	89
Figura 6 - Variação da acidez total titulável dos tratamentos avaliados (revestimentos controle e adicionados de culturas probióticas) ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C.....	91
Figura 7 - Variação do teor de sólidos solúveis (°Brix) das fatias de goiaba revestidas (controle e adicionadas de culturas probióticas) ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C.....	92
Figura 8 - Variação da perda de massa dos diferentes tratamentos de fatias de goiaba revestidas ao longo do período de armazenamento refrigerado.	93
Figura 9 - Variação da firmeza (N) das fatias de goiaba dos diferentes tratamentos avaliados ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C	94

Figura 10- Variação do parâmetro Luminosidade (L^*) da cor das fatias de goiaba dos tratamentos avaliados ao longo do período de armazenamento refrigerado. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos sobre a elaboração de revestimentos comestíveis adicionados de ingredientes ativos.....	8
Tabela 2- Estudos sobre revestimentos comestíveis a base de pectina e sua aplicação em vegetais.....	11

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Revestimentos de pectina incorporados com micro-organismos probióticos...34	
Tabela 2 – Inibição do crescimento de bactérias indicadoras pelas culturas probióticas adicionadas no revestimento comestível.	42
Tabela 3 – Valores médios de pH, viscosidade, cor, índice de brancura e turbidez dos revestimentos avaliados ao longo do período de armazenamento refrigerado	44

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Cenouras minimamente processadas adicionadas ou não revestimento comestível	55
Tabela 2 – Contagem padrão em placas inicial e final de fungos filamentosos e leveduras e de psicrotróficos em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos armazenados a 4 °C	61
Tabela 3 - Contagem média de bactérias probióticas em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos durante 12 dias de armazenamento a 4 °C	63
Tabela 4 – Contagem padrão em placas média (Log UFC g ⁻¹) de <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i> em cenouras minimamente processadas revestidas armazenadas a 4 °C	67
Tabela 5 – Firmeza das fatias de cenoura, revestidas ou não, durante 12 dias de armazenamento a 4 °C.....	68
Tabela 6 – Valores médios dos parâmetros (L*, a*, b*) e índices de qualidade (hue, chroma, índice de cor – IC, índice de brancura – IB e diferença total de cor - ΔE) da cor das fatias de cenoura ao longo do período de armazenamento a 4 °C	70
Tabela 7 – Comparação das médias de acidez total titulável (ATT), pH e sólidos solúveis totais (SST) do dia inicial e final de armazenamento	72

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Goiabas minimamente processadas adicionadas de revestimento comestível.	79
Tabela 2 – Contagem média de bactérias probióticas em goiaba minimamente processada revestidas durante 10 dias de armazenamento a 4 °C	84
Tabela 3 - Valores da contagem média (Log UFC g ⁻¹) de <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i> em fatias de goiaba minimamente processada com revestimento contendo bactérias probióticas armazenadas a 4 °C	88
Tabela 4 - Valores da contagem de bactérias psicrótróficas e fungos filamentosos e leveduras em fatias de goiaba revestidas durante 10 dias de armazenamento a 4 °C	89
Tabela 5 - Valores médios das características físicas e químicas das fatias de goiaba minimamente processada revestidas e armazenadas a 4°C	90
Tabela 6 – Variações nos parâmetros de cor de fatias de goiaba revestidas com pectina (controle e adicionada de culturas probióticas) durante 10 dias de armazenamento a 4 °C	94

RESUMO

Rodrigues, Marcela Zonta, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2017.
Obtenção de revestimentos comestíveis a base de pectina como veículo para micro-organismos probióticos e aplicação em cenoura e goiaba minimamente processadas.
Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadoras: Érica Nascif Rufino Vieira e Eliane Maurício Furtado Martins.

As culturas probióticas estão disponíveis para o consumidor, principalmente, em produtos lácteos. Contudo o interesse pela incorporação destes micro-organismos em outras bases alimentares é crescente. As matrizes vegetais são boa alternativa para a incorporação destes micro-organismos, no entanto é necessário o desenvolvimento de diferentes técnicas para inserir as bactérias probióticas em vegetais. Esta pesquisa objetivou desenvolver revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação para veicular micro-organismos probióticos em cenoura e goiaba minimamente processadas. Na primeira etapa do estudo, foi produzido o revestimento a base de pectina de baixa metoxilação, sendo os tratamentos controle e adicionados de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LA3, *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286), *Lactobacillus paracasei* BGP1, *Lactobacillus acidophilus* LA3 em combinação com *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286), *Lactobacillus acidophilus* LA3 em combinação com *Lactobacillus paracasei* BGP1 e *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286) em combinação com *Lactobacillus paracasei* BGP1). Os revestimentos comestíveis foram avaliados quanto à sua estabilidade microbiológica (viabilidade e resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* das culturas probióticas e atividade antimicrobiana frente à *Listeria innocua* ATCC33090 e *Escherichia coli* ATCC11229), física (viscosidade, cor, índice de brancura e turbidez) e química (pH) durante 12 dias de armazenamento. Na segunda etapa do estudo, avaliou-se a aplicação do revestimento comestível em cenoura e goiaba minimamente processadas e a estabilidade dos produtos obtidos armazenados a 4 °C. Cenoura e goiaba minimamente processadas contendo os revestimentos comestíveis foram avaliadas quanto a qualidade microbiológica, viabilidade e resistência às condições gastrointestinais *in vitro* dos probióticos, microscopia eletrônica de varredura (MEV), perda de massa, firmeza, composição da cor, pH, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis totais. O revestimento comestível apresentou-se como bom carreador de bactérias probióticas, além de alguns tratamentos apresentarem atividade antimicrobiana. A adição de bactérias

probióticas ao revestimento comestível alterou ($p < 0,05$) pH, cor, índice de brancura e turbidez. As bactérias probióticas apresentaram-se viáveis quando os revestimentos comestíveis foram adicionados as cenoura e goiaba minimamente processadas. A MEV mostrou que as bactérias probióticas apresentaram-se bem distribuídas por toda a superfície da cenoura e goiaba minimamente processadas revestidas. A adição do revestimento comestível às fatias de cenoura e goiaba minimamente processadas não alterou ($p > 0,05$) a qualidade microbiológica e as características físicas e químicas dos produtos avaliados. Portanto, o revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação contendo bactérias probióticas é uma boa alternativa para veicular estes micro-organismos, através dos vegetais minimamente processados, até o consumidor.

ABSTRACT

Rodrigues, Marcela Zonta, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2017. **Obtaining of edible coatings on the basis of pectin as a vehicle for microorganisms probiotics and application in carrots and guavas minimally processed.** Advisor: Afonso Mota Ramos. Co-advisors: Érica Nascif Rufino Vieira and Eliane Maurício Furtado Martins.

The probiotic cultures are available for the consumer especially in dairy products. However, the interest by the incorporation of these microorganisms in other food bases is growing. The vegetables matrices are a good alternative for the incorporation of these micro-organisms, it is necessary to the development of different techniques to deliver the probiotic bacteria to vegetables. The objective of this research was to develop low methoxylated pectin based edible coating to deliver probiotic microorganisms to minimally processed carrots and guavas. In the first stage of the study, low methoxylation pectin edible coating was produced, control treatment and addition of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* LA3, *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286), *Lactobacillus paracasei* BGP1, *Lactobacillus acidophilus* LA3 in combination with *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286), *Lactobacillus acidophilus* LA3 in combination with *Lactobacillus paracasei* BGP1 e *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286) in combination with *Lactobacillus paracasei* BGP1). The edible coatings were evaluated for their microbiological stability (viability and resistance to simulated in vitro gastrointestinal conditions of probiotic cultures and antimicrobial activity against *Listeria innocua* ATCC33090 and *Escherichia coli* ATCC11229), physical (viscosity, color, whiteness index and turbidity) and chemical (pH) for 12 days storage. In the second stage of the study, were evaluated the application of the edible coating in minimally processed carrots and guavas and the stability of the obtained products stored at 4 ° C. Minimally processed carrots and guavas containing the edible coatings were evaluated for microbiological quality, viability and resistance in vitro gastrointestinal conditions of probiotics, scanning electron microscopy (SEM), loss of mass, firmness, color composition, pH, titratable total acidity and total soluble solids content. The edible coating presented as a good carrier of probiotic bacteria, in addition to some treatments presenting antimicrobial activity. The addition of probiotic bacteria to the edible coating altered (p<0.05) pH, color, whiteness index and tubidity. Probiotic bacteria were viable when edible coatings were added to minimally processed carrots and guavas. SEM

showed that probiotic bacteria were well distributed throughout the surface of minimally processed coated carrot and guava. The addition of the edible coating minimally processed carrot and guava did not modify ($p > 0.05$) the microbiological quality and the physical and chemical characteristics of the evaluated products. Therefore, the low methoxylation pectin edible coating containing probiotic bacteria is a good alternative for transference these microorganisms through minimally processed vegetables to the consumer.

INTRODUÇÃO GERAL

O crescente aumento do conhecimento dos consumidores sobre o impacto que os alimentos ocasionam na saúde contribuiu para um aumento da demanda por diferentes produtos alimentícios contendo ingredientes funcionalmente ativos (KANMANI; LIM, 2013; TRIPATHI; GIRI, 2014), sendo os produtos que incorporam em sua composição as bactérias probióticas os mais procurados pelos consumidores.

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os benefícios dos probióticos são dependentes da dose diária ingerida, que varia de 6,00 – 9,00 Log UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ (LÓPEZ DE LACEY et al., 2012). A maioria das estirpes bacterianas probióticas são pertencentes ao grupo de bactérias lácticas e sua funcionalidade, geralmente, depende da estirpe probiótica (KANMANI; LIM, 2013). São vários os benefícios para a saúde atribuídos à estes micro-organismos destacando-se a produção de substâncias antimicrobianas, regulação do trato gastrointestinal, estimulação da resposta imune do hospedeiro, redução dos níveis de colesterol no soro, redução da intolerância à lactose, diminuição da síndrome do intestino irritável e prevenção de doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer (TAVERA-QUIROZ et al., 2015).

A adição de bactérias probióticas em produtos lácteos é amplamente utilizada e, isso se deve ao fato dessa matriz alimentar apresentar bom suporte nutricional para esses micro-organismos. No entanto, o crescente número de indivíduos com intolerância à lactose, alergia as proteínas do leite e, até mesmo aqueles que optam por não consumirem produtos de origem animal reforçam a busca por matrizes alimentares vegetais capazes de veicular as bactérias probióticas (MARTINS et al., 2013). Diversos estudos vêm relatando o uso de micro-organismos probióticos em alimentos de origem vegetal tais como produtos a base de soja, sucos de frutas, vegetais fermentados, *smoothies* de frutas, *snackers* de frutas, azeitonas, cereais matinais, bebida de malte e frutas e hortaliças minimamente processadas.

A maneira de aplicação das bactérias probióticas em vegetais minimamente processados ocorre geralmente através da inoculação direta do micro-organismo no alimento, entretanto, essa forma de aplicação muitas vezes pode ser ineficiente tornando necessário a busca por novas alternativas para a adição dos probióticos nesses alimentos, de modo a garantir a veiculação e sobrevivência desses micro-organismos.

Revestimentos comestíveis vêm sendo estudados como bons transportadores para a incorporação de compostos ativos, tais como, vitaminas, antioxidantes, probióticos e antimicrobianos em alimentos (SOUKOULIS et al., 2014a). Eles são finas camadas de materiais biopoliméricos comestíveis aplicados à superfície dos alimentos, como frutas e hortaliças minimamente processadas, proporcionando uma barreira contra a migração da umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas e outros solutos (MISIR; BRISHTI; HOQUE, 2014).

Estudos recentes demonstram que isolado protéico de soro, caseinato de sódio (BERISTAIN-BAUZA et al., 2016), kefirano (PIERMARIA et al., 2015), metilcelulose (ROMANO et al., 2014; TAVERA-QUIROZ et al., 2015), alginato de sódio combinado com concentrado protéico (SOUKOULIS et al., 2014a), pululano, amido (KANMANI; LIM, 2013) e gelatina (LÓPEZ DE LACEY et al., 2012) são matrizes adequadas para imobilizar micro-organismos probióticos. Dessa forma, os revestimentos comestíveis são apresentados como uma possibilidade real para veicular probióticos em sistemas alimentares onde eles não podem ser incorporados por inoculação direta, além de se apresentarem como uma via promissora para proteger esses micro-organismos das condições de processamento dos alimentos e condições do trato gastrointestinal (SOUKOULIS et al., 2014a).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a adição de bactérias probióticas em revestimentos comestíveis à base de pectina e a aplicação dos revestimentos em cenoura e goiaba minimamente processadas.

Objetivos Específicos

- ✓ Incorporar bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* combinado com *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* combinado com *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* combinado com *Lactobacillus paracasei*) em revestimento comestível à base de pectina de baixa metoxilação.
- ✓ Determinar a viabilidade das bactérias probióticas incorporadas no revestimento comestível.
- ✓ Avaliar a resistência dos micro-organismos probióticos presentes nos revestimentos comestíveis frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.
- ✓ Avaliar as propriedades físicas e químicas (viscosidade, potencial hidrogeniônico (pH), cor, índice de brancura e turbidez) dos revestimentos obtidos, com o intuito de verificar se houve influência da adição das bactérias probióticas.
- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis frente à *Escherichia coli* e *Listeria innocua*.
- ✓ Determinar a viabilidade das bactérias probióticas em cenoura e goiaba minimamente processadas recobertas com os revestimentos comestíveis.
- ✓ Avaliar a resistência dos micro-organismos probióticos presentes nos revestimentos comestíveis adicionados na cenoura e goiaba minimamente processadas frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.
- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis nos vegetais minimamente processados inoculados com *Escherichia coli* e *Listeria innocua*.
- ✓ Avaliar a vida de prateleira de cenoura e goiaba minimamente processadas recobertas com revestimentos comestíveis por meio das análises microbiológicas (psicrotróficos, *Salmonella* sp. e fungos filamentosos e leveduras), físicas (microscopia eletrônica de varredura, perda de água, firmeza e cor) e químicas (acidez total titulável, pH e teor de sólidos solúveis totais).

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Vegetais minimamente processados

O consumo de frutas e hortaliças, bem como de produtos derivados, tem aumentado significativamente ao longo dos anos, uma vez que os consumidores estão à procura de alimentos que proporcionem benefícios à saúde.

Frutas e hortaliças minimamente processadas tornaram-se uma importante área com potencial crescimento de comercialização devido ao aumento da demanda do consumidor por alimentos convenientes que requerem um menor tempo de preparo ou que sejam prontos para o consumo e que apresentem características semelhantes ao produto *in natura*.

Segundo Moretti e Machado (2006), o surgimento dos alimentos minimamente processados ocorreu em 1938, ano em que vários tipos de saladas embaladas já podiam ser encontrados em quitandas e pequenos mercados na costa oeste dos Estados Unidos. Entretanto, a atividade de processamento mínimo de frutas e hortaliças começou realmente a crescer nos Estados Unidos, a partir da década de 50 com o surgimento das redes de alimentação rápida (*fast-food*). No Brasil, o início da atividade de processamento mínimo ocorreu com a chegada das redes de *fast-food*, no final da década de 70 (MORETTI; MACHADO, 2006) e, a partir de então pôde-se observar um consecutivo aumento no consumo de frutas e hortaliças minimamente processadas.

Os vegetais minimamente processados são alimentos que apresentam os tecidos vivos, definidos como frutas ou hortaliças ou qualquer combinação destas que tenham sido alteradas fisicamente, mas que mantenham seus atributos de qualidade similares ao produto *in natura* preservando suas características (SILVA et al., 2011). Além disso, vegetais minimamente processados passam por processos de seleção, lavagem, descascamento, corte, sanitização, drenagem e embalagem, visando conservar características dos alimentos frescos, preservar suas propriedades nutritivas e prolongar a sua vida útil (OLIVEIRA et al., 2015).

No entanto, o processamento mínimo altera a integridade do alimento e induz danos superficiais no tecido vegetal, o que acarreta modificações físicas, metabólicas e bioquímicas, tais como aumento na taxa respiratória e liberação de enzimas e substratos levando à deterioração da qualidade, promovendo escurecimento, perda de aroma e textura e crescimento microbiano (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR;

MARTÍN-BELLOSO, 2008; ROJAS-GRAÜ; TAPIA; MARTÍN-BELLOSO, 2008; NARSAIAH et al., 2015). Estes produtos devem cumprir a funcionalidade esperada sem alterações significativas das propriedades físicas e químicas e do valor nutricional durante a sua vida de prateleira.

Frutas e hortaliças minimamente processadas são consumidas, principalmente, cruas. Dessa forma, elas representam um potencial perigo para a segurança microbiológica, especialmente quando processadas sob condições sanitárias insatisfatórias (GLEESON; BEIRNE, 2005). Diante disso, o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes é um desafio para a indústria de alimentos minimamente processados.

Os vegetais frescos são altamente perecíveis e perdas podem ser de grande importância se medidas corretas de boas práticas agrícolas durante a pós-colheita não forem realizadas. Dessa forma, se torna necessário o emprego de técnicas para reduzir os processos metabólicos que conduzem à rápida senescência, de modo que os vegetais minimamente processados possam manter a sua qualidade por um período de tempo maior (GUERREIRO et al., 2015a). Vários métodos físicos e químicos vêm sendo avaliados para reduzir a contaminação e promover a conservação de frutas e hortaliças minimamente processadas, mas estes em grande parte não foram eficazes para estender a vida útil sem comprometer a qualidade do produto (RAMOS et al., 2013). Dentre os métodos utilizados para conservar os vegetais minimamente processados destaca-se a refrigeração, uso de embalagem com atmosfera modificada ou controlada, inibidores de escurecimento, produtos a base de cálcio, uso de 1-metil ciclopropeno e aplicação de revestimentos ou filmes comestíveis.

2. Revestimentos Comestíveis

Revestimentos comestíveis são formados por uma ou várias camadas finas, de qualquer tipo de material, aplicados diretamente sobre a superfície dos alimentos com a finalidade de prolongar a vida de prateleira do produto podendo ser ingeridos juntamente com os alimentos (GONZÁLEZ -AGUILAR et al., 2010; WANG et al., 2010; HAMZAH et al., 2013). Em frutas e hortaliças minimamente processadas, os revestimentos comestíveis são utilizados, de maneira geral, como uma estratégia de barreira a contaminação microbiana e para reduzir os efeitos deletérios do processamento (ROJAS-

GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTIN-BELLOSO, 2009; MOREIRA; ROURA; PONCE, 2011; ALDANA et al., 2015).

O material comestível ideal utilizado para o revestimento de alimentos deve ser isento de qualquer componente tóxico, alérgico ou não digerível e deve ser facilmente produzido e economicamente viável (JANJARASSKUL; KROCHTA, 2010). O material de revestimento deve fornecer estabilidade estrutural, boa propriedade de adesão à superfície do alimento, semi-permeabilidade, barreira à umidade, oxigênio e movimento de soluto e deve manter os atributos sensoriais do produto (RHIM; LEE; NG, 2007; JANJARASSKUL; KROCHTA, 2010). Deve, também, proteger contra a contaminação, a infestação de pragas, a multiplicação microbiana e outros tipos de deterioração (FALGUERA et al., 2011).

As propriedades físicas do revestimento comestível estão diretamente ligadas às condições do processo de aplicação, sendo na indústria de alimentos a pulverização e a imersão as principais técnicas utilizadas. A técnica de pulverização resulta em um revestimento uniforme com espessura controlada e possibilita a aplicação de multicamadas e a de imersão é dependente de propriedades do revestimento como densidade, viscosidade e tensão superficial possibilitando a formação de camadas grossas de revestimento (VALDÉS et al. 2017). Revestimentos comestíveis, mesmo se não consumidos juntamente com os alimentos, não contribuem para a poluição do ambiente devido à sua natureza biodegradável em comparação com polímeros sintéticos convencionais.

Os componentes usados para a preparação dos revestimentos comestíveis podem ser classificados em três categorias: polissacarídeos (amido, derivados de celulose, alginato, carragena, quitosana e pectina), proteínas (caseína, proteína de soja, zeína, proteínas formadoras do glúten, queratina, albumina e gelatina), lipídeos (glicéridos, cera de abelha, cera de carnaúba, cera de polietileno e óleo mineral) e compostos (quando os materiais são utilizados em combinação) (ROJAS-GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTIN-BELLOSO, 2009; SOUZA et al., 2010; DHALL, 2013; FAGUNDES et al., 2014).

Para a preparação do revestimento comestível devem ser avaliados diversos parâmetros tais como, tipo de material aplicado como matriz estrutural, condições em que os revestimentos são formados (tipo de solvente, pH, temperatura e concentração de componentes) e o tipo e concentração dos aditivos (plastificantes, agentes de reticulação,

antioxidantes, antimicrobianos, emulsionantes, entre outros). Estas características influenciam diretamente as propriedades mecânicas (flexibilidade e tensão), propriedades ópticas (brilho e opacidade), efeito de barreira contra o fluxo de gases, resistência estrutural à água e contaminação microbiana (ROJAS-GRAÜ; TAPIA; MARTÍN-BELLOSO, 2008; ROJAS-GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2009).

O comportamento mecânico e de barreira dos revestimentos comestíveis são intrinsecamente associados com as características físicas e químicas dos seus constituintes (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2014), por exemplo, revestimentos a base de proteínas e polissacarídeos são hidrofílicos e geralmente fornecem uma boa barreira ao oxigênio e difusão de dióxido de carbono, entretanto apresentam uma fraca barreira ao vapor de água (GARCÍA; MARTÍNÓ; ZARITZKY, 1998). A adição de plastificantes a esses tipos de revestimentos aumenta a flexibilidade e capacidade de processamento do revestimento, aumentando o volume livre ou mobilidade molecular dos polímeros, e alteram a permeabilidade ao vapor de água, tornando-os menos hidrofílicos, além de poderem aumentar a permeabilidade do filme ao oxigênio. Portanto, a adição de plastificantes, tais como glicerol, são necessários para revestimentos comestíveis à base de polissacarídeos e proteínas (ROJAS-GRAÜ; TAPIA; MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Revestimentos comestíveis têm sido descritos como bons transportadores, para a incorporação em alimentos de ingredientes ativos (Tabela 1), tais como antioxidantes, corantes, aromatizantes, flavorizantes, nutrientes, compostos bioativos, antimicrobianos (ROJAS-GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2009; CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2011; CHENG; WANG; MING WENG, 2015) e probióticos (SOUKOULIS et al., 2014a). Dessa forma, os revestimentos comestíveis são apresentados como bons transportadores para carrear micro-organismos probióticos em alimentos que eles não podem ser incorporados por inoculação direta, além de se apresentarem como uma via promissora para proteger esses micro-organismos das condições de processamento dos alimentos e condições do trato gastrointestinal (SOUKOULIS et al., 2014a).

Tabela 3 - Estudos sobre a elaboração de revestimentos comestíveis adicionados de ingredientes ativos

Função	Ingrediente Ativo	Material de Revestimento	Aplicação	Referência
Antimicrobiano	Sorbato de potássio, Metilparabeno de sódio e Etilparabeno de sódio	Hidroxipropil metilcelulose	Ameixa	Gunaydin et al. (2017)
	Óleo essencial de <i>Myrcia ovata</i> Cambessedes (MYRO-174 e MYRO -175)	Quitosana e Amido	Mangada	Frazão; Blank; Santana (2017)
	Óleo essencial de capim limão	Quitosana	Uva	Oh et al. (2017)
	Citral e Eugenol	Alginato de sódio e Pectina	Maçã minimamente processada	Guerreiro et al. (2017)
	Carvacrol e Cinamato de metila	Alginato de sódio	Morango	Peretto et al. (2017)
	Sorbato de Potássio e Benzoato de sódio	Pectina	Caqui minimamente processado	Sanchís et al. (2016)
Antimicrobiano e Antioxidante	Óleo essencial de orégano	Pectina	Tomates	Rodriguez-Garcia et al. (2016)
Antioxidante	Ácido cítrico e Cloreto de cálcio	Pectina	Caqui minimamente processado	Sanchís et al. (2016)
	Ácido Ferúlico e Ascorbato de sódio	Isolado proteico de soja	Maçã minimamente processada	Alves; Gonçalves; Rocha (2017)
	Óleo essencial de lima, limão e laranja	Alginato de sódio	Framboesa vermelha	Gomes et al. (2017)
	Própolis	Fécula de mandioca	Morango	Thomas et al. (2016)
	Extrato de pele de amêndoas e Butilhidroxitolueno (BHT)	Carboximetil celulose	Amêndoa	Larrauri et al. (2016)
Probiótico	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Carboximetil celulose	-	Ebrahimi et al. (2018)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus pentosus</i>	Alginato de Sódio	Presunto fatiado	Pavli et al. (2017)

Probiótico	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Pectina, Alginato de sódio, Gelatina, Kappa-carragena/Goma de alfarroba e Concentrado proteico de soro de leite	-	Soukoulis et al. (2017)
	<i>Lactobacillus casei</i>	Soro de leite, Inulina e Gelatina	Biscoito Cracker	García-Argueta et al. (2016)
	<i>Bifidobacterium animalis</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	Isolado proteico de soro de leite	-	Pereira et al. (2016)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Amido de milho e de arroz, Gelatina de pele bovina, Caseinato de sódio e Concentrado proteico de soja	-	Soukoulis et al. (2016)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Metilcelulose	Snacks de maçã	Tavera-Quiroz et al. (2015)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kefirano	-	Piermaria et al. (2015)
	<i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i>	Ágar	Filé de Merluza	López de Lacey; López-Caballero; Montero (2014)
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> e <i>L. plantarum</i>	Metilcelulose	-	Romano et al. (2014)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus reuteri</i>	Metilcelulose e Caseinato de sódio	-	Sánchez-González; Saavedra; Chiralt (2014)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Alginato de sódio e Concentrado proteico de soro	Pão	Soukoulis et al. (2014a)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Gelatina e Fibras prebióticas	-	Soukoulis et al. (2014b)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Pululano e Amido de batata, tapioca e milho	-	Kanmani; Lim (2013)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gelatina	Filé de Merluza	López de Lacey et al. (2012)

3. Pectina

Pectina é um polissacarídeo, branco, amorfo e coloidal de alto peso molecular encontrada em frutas cítricas que apresenta propriedades espessantes e emulsionantes e capacidade de solidificar formando um gel (VALDÉS et al., 2015). Sua estrutura consiste de moléculas de α -(1→4)-D-ácido galacturônico ligadas a um número pequeno de resíduos de ramnose na cadeia principal e arabinose, galactose e xilose nas cadeias laterais (KOHLI; GUPTA, 2015). A pectina apresenta-se parcialmente metoxilada com metanol e, de acordo com o grau de grupos carboxílicos metoxilados é classificada como de baixa metoxilação (< 50% de metoxilação) ou de alta metoxilação (\geq 50% de metoxilação) (KASTNER; EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2017).

Diferentes interações intermoleculares estão envolvidas na geleificação de pectinas. A pectina de baixa metoxilação possui maior quantidade de grupos carboxílicos livres e sua geleificação envolve interações intermoleculares entre cátions (exemplo Ca^{+2}) e as cavidades carregadas negativamente formada pela cadeia de polímeros, resultando na formação de uma rede tridimensional reticulada, já a pectina de alta metoxilação é necessário um meio ácido na presença de um co-soluto, geralmente a sacarose, promovendo interações entre os grupos carboxílicos (FRAEYE et al., 2010).

Devido as suas propriedades coloidais a pectina apresenta elevado potencial como componente para o desenvolvimento de revestimentos comestíveis (CAZON et al., 2017). Segundo Valdés et al. (2015) e Gutierrez-Pacheco et al. (2016), revestimentos comestíveis à base de pectina apresentam excelente barreira ao oxigênio e dióxido de carbono, preservação do aroma e boas propriedades mecânicas, mas não apresentam boa barreira a perda de água, uma vez que possuem natureza hidrofílica. Entretanto, os revestimentos comestíveis produzidos com pectina pura podem promover o crescimento microbiano, uma vez que a pectina é utilizada como fonte de carbono por bactérias e fungos filamentos e leveduras (GUTIERREZ-PACHECO et al., 2016).

O principal tipo de pectina utilizada na formulação de revestimento comestível é a de baixo grau de metoxilação devido a sua capacidade de formar géis firmes a pH baixo e na presença de cátions de cálcio e sem a necessidade da adição de açúcar, promovendo maior firmeza e integridade estrutural além de reduzir a permeabilidade ao vapor de água (VALDÉS et al., 2015).

Pectina tem sido utilizada como revestimento comestível para frutas e hortaliças, sendo apresentados na Tabela 2 trabalhos que utilizaram apenas a pectina como polissacarídeo para a formulação dos revestimentos.

Tabela 4- Estudos sobre revestimentos comestíveis a base de pectina e sua aplicação em vegetais

Tipo de Pectina	Aplicação	Referência
Baixa metoxilação	Maçã minimamente processada	Moreira et al. (2017)
Alta metoxilação	Mirtilo	Mannozi et al. (2017)
Alta metoxilação	Caqui	Sanchís et al. (2017)
Não especificado	Sapota	Menezes; Athmaselvi (2016)
Baixa metoxilação	Mamão papaia minimamente processado	Canizares; Mauro (2015)
Alta metoxilação	Caqui	Sanchís et al. (2016)
Sem especificação	Raspberries (<i>Rubus idaeus</i> L.)	Guerreiro et al. (2015b)
Baixa metoxilação	Maçã minimamente processada	Moreira et al. (2015)
Baixa metoxilação	Mamão papaia minimamente processado	Garcia et al. (2014)
Baixa metoxilação	Melão minimamente processado	Ferrari et al. (2013)
Não especificado	Pimentões	Ochoa-Reyes et al. (2013)
Alta metoxilação	Mamão papaia minimamente processado	Brasil et al. (2012)
Alta metoxilação	Manga inteira	Moalemiyan; Ramaswamy; Maftoonazad (2012)

4. Probióticos

A tendência de consumo com relação à escolha dos alimentos estão mudando devido à crescente consciência da relação existente entre dieta e saúde. Conseqüentemente, a ingestão de alimentos funcionais tem aumentado significativamente ao longo dos últimos anos. São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem benefícios à saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SCHIEBER, 2012). As principais substâncias que conferem "funcionalidade" para os alimentos são as vitaminas,

flavonóides, fibras, ômega-3, carotenoides, minerais e bactérias probióticas (KESERVANI et al., 2010).

Segundo Goldin (1998), a palavra probiótico foi introduzida por Lilley e Stillwell, em 1965, para descrever micro-organismos que desempenham atividades benéficas. Posteriormente, os probióticos foram definidos como ingredientes alimentares contendo micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidade adequada apresentam efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

O interesse crescente dos consumidores por alimentos probióticos se deve à extensa divulgação de estudos que apontam que o consumo regular destes micro-organismos tem efeito benéfico sobre a saúde humana. Dentre os benefícios do consumo de culturas probióticas destacam-se controle de infecções gastrointestinais, redução da intolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol, controle da pressão arterial, propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e anti-diarreicas, redução de doença inflamatória intestinal, supressão da infecção por *Helicobacter pylori* (TAVERA-QUIROZ et al., 2015), melhoria das respostas imunológicas por meio da ativação dos macrófagos e aumento dos níveis de citocinas e de imunoglobulinas (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010; COSTA; VARAVALLO, 2011).

Dentre as bactérias probióticas destacam-se as estirpes pertencentes ao grupo de bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus lactis*. No entanto, estirpes de *Bifidobacterium* também são consideradas probióticas (PRADO et al., 2008), sendo as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos.

A eficácia da adição de bactérias probióticas em alimentos depende da quantidade de células do inóculo e de sua viabilidade que deve ser mantida durante a vida de prateleira do produto. Para que seja observado o efeito benéfico em humanos, a contagem de bactérias probióticas viáveis deve variar de 6,0 a 9,0 UFC mL⁻¹ ou g⁻¹ (LÓPEZ DE LACEY et al., 2012).

Um micro-organismo probiótico deve sobreviver no alimento e também resistir aos ácidos, sais biliares e enzimas ao longo do trato digestivo, sendo capazes de agregar-se como parte da microbiota natural e apresentar efeitos benéficos após aderir ao intestino do hospedeiro (MITSUOKA, 2014). A maioria dos estudos mostra que o melhor efeito é alcançado quando os micro-organismos colonizam o epitélio intestinal, uma vez que

podem afetar o sistema imunológico, deslocar os agentes patogênicos entéricos e fornecer substâncias antimutagênicas e anti-oxidantes para o organismo (PARK; MIN; GEUN, 2007).

Bactérias probióticas não apenas promovem benefícios à saúde quando consumidas, mas também podem desempenhar um papel protetor durante o armazenamento contra os agentes deterioradores e patogênicos do alimento, por meio da competição por nutrientes (vitaminas, minerais, oligoelementos e peptídeos) e da produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos) e compostos voláteis, não voláteis e aromáticos (PENNA; TODOROV, 2016). A presença de culturas com propriedades inibidoras podem estender a vida de prateleira e a segurança dos produtos reduzindo, assim, a necessidade da utilização de níveis elevados de aditivos químicos.

A principal matriz carreadora de probióticos é a matriz láctea (VICENTINI; LIBERATORE; MASTROCOLA, 2016). Entretanto, a demanda por produtos probióticos não lácteos vem aumentando (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2015) devido ao vegetarianismo, elevado conteúdo de colesterol presente nos derivados lácteos, intolerância à lactose e outros fatores relacionados com o consumo de produtos derivados de leite (BETORET et al., 2012). Com isso, os probióticos foram incorporados em bebidas e suplementos sob a forma de comprimidos, cápsulas e preparações liofilizadas e tem-se observado o desenvolvimento de produtos probióticos a partir de matrizes diversas, incluindo as frutas e produtos hortícolas (MARTINS et al., 2013), uma vez que estes apresentam a vantagem de serem ricos em sais minerais, vitaminas, fibras e antioxidantes (fitoquímicos) e não possuem substâncias alergênicas que possam impedir o uso por determinados segmentos da população (MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2015).

4.1. Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* compreende um grupo taxonômico heterogêneo e grande de micro-organismos que pertencem às bactérias ácido lácticas, com 201 espécies atualmente conhecidas (BULL et al., 2014). São colonizadores naturais do trato gastrointestinal humano e um gênero subdominante do cólon, portanto, geralmente são considerados seguros (REN et al., 2013).

Os *Lactobacillus* são gram-positivos, do tipo bastonetes, retos ou curvos, ocorrendo isolados ou em cadeia, catalase negativos, anaeróbios ou aerotolerantes, não esporulados, fastidiosos, mesofílicos (condições ótimas para sua multiplicação são de 35-40 °C) e produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015), motivo pelo qual sobrevivem em ambientes mais ácidos. Algumas cepas de *Lactobacillus* também possuem a capacidade de aderir a receptores específicos na membrana intestinal, o que evita sua eliminação pelos movimentos peristálticos e possibilita a competição com outros micro-organismos por sítios de ligação bloqueando a adesão de agentes patogênicos (REN et al., 2013).

Os lactobacilos podem ser encontrados em uma variedade de habitats desde que estes sejam ricos em nutrientes tais como, animais vertebrados e invertebrados, humanos (membranas das mucosas, cavidade oral, intestinal e vaginal), plantas e material orgânico, alimentos (cereais e outros vegetais, bebidas fermentadas, queijos e outros produtos lácteos, carnes e derivados) e habitats artificiais, como esgotos (DUAR et al., 2017).

No organismo humano foram isolados diversos lactobacilos sendo na mucosa do estômago encontrado *L. antri*, *L. gastricus*, *L. kalixensis*, *L. reuteri* e *L. ultunensis*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. fermentum* e *L. gasseri*, no trato gastrointestinal existe uma grande variedade incluindo *L. fermentum*, *L. casei* e *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. plantarum* (MOAL; SERVIN, 2014) e no sistema genitourinário feminino *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* e *L. iners* (JESPERS et al., 2012).

Algumas estirpes pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são empregadas como probióticos por apresentarem alguns benefícios à saúde do hospedeiro quando administradas nas condições adequadas e por serem consideradas seguras (GRAS – “generally recognized as safe”) pela *Food and Drug Administration* (FDA), devido a sua longa história de uso seguro e sua presença na microbiota intestinal de seres humanos (PISANO et al., 2014). Segundo Tripathi; Giri (2014), as estirpes de *Lactobacillus* mais utilizadas em aplicações comerciais probióticas são *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*.

4.1.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus faz parte da microbiota humana natural sendo isolado a partir do sistema oral, digestivo e vaginal e, é uma estirpe comumente recomendada para

uso dietético sendo amplamente reconhecida por ter efeitos probióticos (BULL et al., 2013).

Este micro-organismo é homofermentador obrigatório e é capaz de utilizar uma variedade de fontes de carbono para o seu crescimento o que provavelmente contribui para a sua competitividade no trato gastrointestinal humano (BULL et al., 2013). Apresenta-se na forma de bacilos curtos com pontas arredondadas ocorrendo isolados ou em cadeia, gram-positivo, mesofílico (crescimento ideal entre 37 e 42 °C), tolerante a meios ácidos (maior taxa de crescimento em pH 5,5-6,0) (GOMES; MALCATA, 1999; BULL et al., 2013), intolerante ao sal (GOMES; MALCATA, 1999) e, microaerofílico sendo um dos lactobacilos menos resistentes ao oxigênio (BULL et al., 2013).

Para o seu cultivo em laboratório é necessário a utilização de meios ricos em nutrientes, como o ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), devido a sua incapacidade de sintetizar algumas vitaminas e ser auxotrófico por 14 aminoácidos (BULL et al., 2013) e o emprego de um ambiente em anaerobiose ou com baixas tensões de oxigênio devido a sua característica microaerofílica (GOMES; MALCATA, 1999). Quanto ao seu aspecto as colônias de *L. acidophilus* apresentam pelo menos dois morfotipos, sendo eles colônias lisas e rugosas, quando cultivadas em ágar MRS sob condições normais (BULL et al., 2013). A proporção de crescimento de colônias lisas e rugosas é influenciada pela exposição das células a antibióticos, como Penicillin G (KHALEGHI et al., 2011), e a sais biliares (KHALEGHI et al., 2010) que causam uma mudança dose-dependente para o morfotipo liso.

L. acidophilus possui como características probióticas a capacidade de sobreviver ao trato gastrointestinal devido à tolerância aos sais biliares e a ácidos, habilidade de aderir as células epiteliais do intestino, metabolização da lactose, produção de compostos antimicrobianos como ácidos orgânicos (BULL et al., 2013), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (lactacinas) (KARSKA-WYSOCKI; BAZO; SMORAGIEWICZ, 2010).

4.1.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é uma espécie heterogênea e altamente versátil comumente encontrada em muitos nichos ecológicos, como produtos lácteos, cárneos e vegetais, bem como no trato gastrointestinal de humanos e animais (KAUSHIK et al., 2009; SIEZEN; VAN HYLCKAMA VLIET, 2011). Essa espécie bacteriana tem uma

longa história de ocorrência natural e uso seguro para a preparação de alimentos, incluindo alimentos fermentados (VRIES et al., 2006).

Lactobacillus plantarum é heterofermentativo facultativo (SIEZEN; VAN HYLCKAMA VLIEG, 2011; ZHANG et al., 2016) com a capacidade de fermentar carboidratos de hexose formando ácido lático e carboidratos de pentoses produzindo ácido lático e ácido acético (SABO et al., 2014; VENTIMIGLIA et al., 2015), anaeróbio facultativo, gram-positivo, catalase negativa e não esporulado (DASH et al., 2014).

O potencial para oferecer benefícios para a saúde do hospedeiro difere consideravelmente entre as várias estirpes de *L. plantarum* (KAUSHIK et al., 2009). Comumente as estirpes possuem como características probióticas alta tolerância à ácidos e sais biliares, o que acarreta em habilidade comprovada para sobreviver ao suco gástrico e para transitar e colonizar o trato gastrointestinal de humanos (VRIES et al., 2006; SABO et al., 2014), melhora a função de barreira intestinal e os sintomas da síndrome do intestino irritável (SABO et al., 2014), produção de bacteriocinas (exemplo Plantaricina) e ácidos orgânicos (ZACHAROF; LOVITT, 2012; SABO et al., 2014), produção de exopolissacarídeo (WANG et al., 2015) e apresenta atividade lipolítica devido a capacidade de produzir a enzima esterase (ESTEBAN-TORRES et al., 2015).

4.1.3. *Lactobacillus paracasei*

As estirpes da espécie *L. paracasei* foram isoladas de diversos nichos ecológicos tais como leite cru, plantas, produtos fermentados (leite, queijo e vegetais) e tratos intestinais e sistemas reprodutivos de humanos e animais (BALZARETTI, 2015). Geralmente são considerados seguros para o consumo devido à sua longa história de uso seguro e presença na microbiota fecal (MOROVIC et al., 2017), sendo amplamente utilizado na indústria de alimentos como culturas iniciais para produtos lácteos e também como bactérias com características probióticas (SMOKVINA et al., 2013).

É um micro-organismo homofermentador, gram-positivo, não esporulado, (MOROVIC et al., 2017) que possui como características probióticas aderência à mucosa intestinal, sensibilidade aos antibióticos e resistência aos sucos gastrointestinais, sais biliares, NaCl e baixo pH (BERMUDEZ-BRITO et al., 2015).

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALDANA, D. S.; ANDRADE-OCHO, S.; AGUILAR, C. N.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; NEVÁREZ-MOORILLÓN B, G. V. Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. **Food Control**, v. 50, p. 907-912, 2015.

ALVES, M. M.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. M. R. Effect of ferulic acid on the performance of soy protein isolate-based edible coatings applied to fresh-cut apples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 409-415, 2017.

BALZARETTI, S. **Exploring Lactobacillus paracasei probiosis and metabolic potential**. PhD programme in Food Science, Technology and Biotechnology, Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences. Università Degli Studi Di Milano, 2015.

BERISTAIN-BAUZA, S. C.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BERMUDEZ-BRITO, M.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; ROMERO, F.; GIL, A. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 and its culture supernatant modulate *Salmonella*-induced inflammation in a novel transwell co-culture of human intestinal-like dendritic and Caco-2 cells. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 1-15, 2015.

BETORET, E.; BETORET, N.; ARILLA, A.; BENNÁR, M.; BARRERA, C.; CODOÑER, P.; FITO, P. No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 289–293, 2012.

BRASIL, I. M.; GOMES, C.; PUERTA-GOMEZ, A.; CASTELL-PEREZ, M.E.; MOREIRA, R.G. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 39-45, 2012.

BULL, M. J.; JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; AERTS, M.; VANDAMME, P.; MAIDEN, M. C. J.; MARCHESI, J. R.; MAHENTHIRALINGAM, E. The domestication of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-8, 2014.

BULL, M.; PLUMMER, S.; MARCHESI, J.; MAHENTHIRALINGAM, E. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. **FEMS Microbiology**, v. 349, p. 77–87, 2013.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849–875, 2011.

CANIZARES, D.; MAURO, M. A. Enhancement of Quality and Stability of Dried Papaya by Pectin-Based Coatings as Air-Drying Pretreatment. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p. 1187–1197, 2015.

CAZON, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VAZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017.

CHENG, S. Y.; WANG, B. J.; WENG, Y. M. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 115-121, 2015.

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 20-27, 2014.

COSTA, E. S.; VARAVALLO, M. A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITAC**, v. 4, p. 4-11, 2011.

DASH, G.; RAMAN, R. P.; PRASAD, K. P.; MAKESH, M.; PRADEEP, M. A.; SEM, S. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). **Aquaculture**, v. 432, p. 225-236, 2014.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon: Revisão. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 47, p. 93-98, 2010.

DHALL, R. K. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 435-450, 2013.

DUAR, R. M.; LIN, X. B.; ZHENG, J.; MARTINO, M. E.; GRENIER, T.; PEREZ-MUÑOZ, M. E.; LEULIER, F.; GANZLE, M.; WALTER, J. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 27-48, 2017.

EBRAHIMI, B.; MOHAMMADI, R.; ROUHI, M.; MORTAZAVIAN, A. M.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; KOUSHKI, M. R. Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 54-60, 2018.

ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHEÑO, J. M.; RIVAS, B. DE LAS; MUÑOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 246-252, 2015.

FAGUNDES, C.; PALOU, L.; MONTEIRO, A. R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold

development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, p. 1–8, 2014.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMENEZ, A.; MUNOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**. Working Group Report, 2002.

FERRARI, C. C.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; HUBINGER, M. D. Effect of Osmotic Dehydration and Pectin Edible Coatings on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Melon. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 80–91, 2013.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Fine-tuning the properties of pectin–calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 219-228, 2010.

FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. Optimisation of edible chitosan coatings formulations incorporating *Myrcia ovata* Cambessedes essential oil with antimicrobial potential against foodborne bacteria and natural microflora of mangaba fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 1-10, 2017.

GARCIA, C. C.; CAETANO, L. C.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Influence of Edible Coating on the Drying and Quality of Papaya (*Carica papaya*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2828–2839, 2014.

GARCÍA, M. A.; MARTINÓ, M. N.; ZARITZKY, N. E. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria ananassa*) quality and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3758–3767, 1998.

GARCÍA-ARGUETA, I.; QUINTERO-SALAZAR, B.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; DÍAZ-BANDERA, D.; DUBLÁN-GARCÍA, O. Effect of Edible Coating Based on Whey, Inulin and Gelatine with *Lactobacillus casei* on the Textural and Sensorial Properties of a Cracker Cookie. **Journal of Probiotics & Health**, v. 4, p. 1-7, 2016.

GLEESON, E.; BEIRNE, D. O. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. **Food Control**, v. 16, p. 677–685, 2005.

GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 203-207, 1998.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 98-107, 2015.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GOMES, M. S.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, A. C. G.; GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M. L.; VILAS BOAS, E. V. B.; DIAS, C. M. B.; MANHITA, A. C. C.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. C.; ANTUNES, M. D. C. Effect of edible coatings with essential oils on the quality of red raspberries over shelf-life. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 929-938, 2017.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; AYALA-ZAVALA, G. F.; OLIVAS, G. I.; DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ- PARRILLA, E. Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 5, p. 65–72, 2010.

GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M. L.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. C.; ANTUNES, M. D. C. The effect of edible coatings on the nutritional quality of ‘Bravo de Esmolfe’ fresh-cut apple through shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 210-219, 2017.

GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M. L.; FALEIRO, M. L.; MIGUELA, M. G. C.; ANTUNES, M. D. C. The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 226–233, 2015a.

GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M. L.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. C.; ANTUNES, M. D. C. Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin- and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 138–146, 2015b.

GUNAYDIN, S.; KARACA, H.; PALOU, L.; FUENTE, B. DE LA; PÉREZ-GAGO, M. B. Effect of Hydroxypropyl Methylcellulose-Beeswax Composite Edible Coatings Formulated with or without Antifungal Agents on Physicochemical Properties of Plums during Cold Storage. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

GUTIERREZ-PACHECO, M. M.; ORTEGA-RAMIREZ, L. A.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; SILVAESPINOZA, B. A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. **Chapter 50- Combinational approaches for antimicrobial Packaging: Pectin and cinnamon leaf oil**. In: Barros-Velázquez, J. Antimicrobial food packaging, p. 609e617. San Diego: Academic Press, 2016.

HAMZAH, H. M.; OSMAN, A.; TAN, C. P.; GHAZALI, F. M. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. *Eksotika*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 75, p. 142–146, 2013.

JANJARASSKUL, T.; KROCHTA, M. Edible packaging materials. **LWT - Food Science and Technology-Annual Reviews**, v. 1, p. 415- 448, 2010.

JESPERS, V.; MENTEN, J.; SMET, H.; PORADOSÚ, S.; ABDELLATI, S.; VERHELST, R.; HARDY, L.; BUVÉ, A.; CRUCITTI, T. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. **BMC Microbiology**, v. 30, p. 1-10, 2012.

KARSKA-WYSOCKI, B.; BAZO, M.; SMORAGIEWICZ, W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbiological Research**, v. 164, p. 674-686, 2010.

KANMANI, P.; LIM, S. T. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1041-1049, 2013.

KASTNER, H.; EINHORN-STOLL, U.; DRUSCH S. Structure formation in sugar containing pectin gels - Influence of gel composition and cooling rate on the gelation of non-amidated and amidated low-methoxylated pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 13-20, 2017.

KAUSHIK, J. K.; KUMAR, A.; DUARY, R. K.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. **Plos One**, v. 4, p. 1-11, 2009.

KESERVANI, R. K.; KESHARWANI, R. K.; VYAS, N.; JAIN, S.; RAGHUVANSHI, R.; SHARMA A. K. Nutraceutical and functional food as future food: A review. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, p. 106-116, 2010.

KHALEGHI, M.; KERMANSHAHI, R. K.; ZARKESH-ESFAHANI, S. H. Effects of Penicillin G on morphology and certain physiological parameters of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 822-829, 2011.

KHALEGHI, M.; KERMANSHAHI, R. K.; YAGHOobi, M. M.; ZARKESH-ESFAHANI, S. H.; BAGHIZADEH, A. Assessment of bile salt effects on s-layer production, slp gene expression and some physicochemical properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 749-756, 2010.

KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 279-285, 2015.

LARRAURI, M.; DEMARÍA, M. G.; RYAN, L. C.; ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; NEPOTE, V. Chemical and Sensory Quality Preservation in Coated Almonds with the Addition of Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 81, p. 208-215, 2016.

LÓPEZ DE LACEY, A. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO P. Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v 55, p. 559-564, 2014.

LÓPEZ DE LACEY, A. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Functionality of *Lactobacillus acidophilus*

and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 277–282, 2012.

MANNOZZI, C.; CECCHINI, J. P.; TYLEWICZ, U.; SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; ROCCULI, P.; DALLA ROSA, M.; ROMANI, S. Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 440-444, 2017.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; RODRIGUES, M. Z. Research and Development of Probiotic Products from Vegetable Bases: A New Alternative for Consuming Functional Food. In: R. V. V. Ravishankar; A. B. Jamuna (Org.), **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods**. Boca-Raton: Taylor & Francis Group. p. 207-222, 2015.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. DE O.; MARTINS, J. M. Products of Vegetable Origin: A New Alternative for the Consumption of Probiotic Bacteria. **Food Research International**. v. 51, p. 764-770, 2013.

MENEZES, J.; ATHMASELVI, K. A. Study on Effect of Pectin Based Edible Coating on the Shelf Life of Sapota Fruits. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, p. 1195-1199, 2016.

MISIR, J.; BRISHTI, F. H.; HOQUE, M. M. Aloe vera gel as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits: A Review. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 2, p. 93-97, 2014.

MITSUOKA, T. Development of functional foods. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, p. 117-128, 2014.

MOAL, V. L.-L.; SERVIN, A. L. Anti-infective activities of *lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 167-199, 2014.

MOALEMIYAN, M.; RAMASWAMY, H. S.; MAFTOONAZAD, N. Pectin-based edible coating for shelf-life extension of ‘Aaulfo’ mango. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, p. 572–600, 2012.

MOREIRA, M. R.; ÁLVARES, M. V.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effects of pulsed light treatments and pectin edible coatings on the quality of fresh-cut apples: a hurdle technology approach. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 97, p. 261–268, 2017.

MOREIRA, M. R.; CASSANI, L.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effects of polysaccharide-based edible coatings enriched with dietary fiber on quality attributes of fresh-cut apples. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7795–7805, 2015.

MOREIRA, M. R.; ROURA, S. I.; PONCE, A. Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 2335–2341, 2011.

MORETTI, C.L.; MACHADO, C.M.M. **Aproveitamento de resíduos sólidos do processamento mínimo de frutas e hortaliças**. In: IV Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças e I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos e Cortados. Anais... São Pedro (SP), 2006.

MOROVIC, W.; ROPER, J. M.; SMITH, A. B.; MUKERJI, P.; STAHL, B.; ERA, J. C.; OUWEHAND, A. C. Safety evaluation of HOWARU® Restore (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bi-04 and *B. lactis* Bi-07) for antibiotic resistance, genomic risk factors, and acute toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 316-324, 2017.

NARSAIAH, K.; WILSON, R. A.; GOKUL, K.; MANDGE, H. M.; JHA, S. N.; BHADWAL, S.; ANURAG, R. K.; MALIK, R. K.; VIJ, S. Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 212–218, 2015.

OCHOA-REYES, E.; MARTÍNEZ-VAZQUEZ, G.; SAUCEDO-POMPA, S.; MONTAÑEZ, J.; ROJAS-MOLINA, R.; LEON-ZAPATA, M. A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Improvement of shelf life quality of green bell peppers using edible coating formulations. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, p. 2448-2451, 2013.

OLIVEIRA, K. A. R.; DE SOUSA, J. P.; MEDEIROS, J. A. C.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; MAGNANI, M.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; DE SOUZA, E. L. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, v. 47, p. 334 – 339, 2015.

OH, Y. A.; OH, Y. J.; SONG, A. Y.; WON, J. S.; SONG, K. B.; MIN, S. C. Comparison of effectiveness of edible coatings using emulsions containing lemongrass oil of different size droplets on grape berry safety and preservation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 742-750, 2017.

PARK, M. S.; MIN, J. K.; GEUN, E. J. Assessment of lipopolysaccharide-binding activity of Bifidobacterium and its relationship with cell surface hydrophobicity, autoaggregation, and inhibition of interleukin-8 production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1120–1126, 2007.

PAVLI, F. KOVAIOU, I. APOSTOLAKOPOULOU, G.; KAPETANAKOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.-J. E.; TASSOU, C.; CHORIANOPOULOS, N. Alginate-Based Edible Films Delivering Probiotic Bacteria to Sliced Ham Pretreated with High Pressure Processing. **International Journal Molecular Sciences**, v. 18, p. 1867-1877, 2017.

PENNA, A. L. B.; TODOROV, S. D. Bio Preservation of Cheese by Lactic Acid Bacteria. **EC Nutrition**, v. 4, p. 869-871, 2016.

PEREIRA, J. O.; SOARES, J.; SOUSA, S.; MADUREIRA, A. R.; GOMES, A.; PINTADO, M. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 543-550, 2016.

PERETTO, G.; DU, W.-X.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BERRIOS, J. J.; SAMBO, P.; MCHUGH, T. H. Electrostatic and Conventional Spraying of Alginate-Based Edible Coating with Natural Antimicrobials for Preserving Fresh Strawberry Quality. **Food Bioprocess Technology**, v. 10, p. 165–174, 2017.

PIERMARIA, J.; DIOSMA, G.; AQUINO, C.; GARROTE, G.; ABRAHAM, A. Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 193–199, 2015.

PISANO, M. B.; VIALE, S.; CONTI, S.; FADDA, M. E.; DEPLANO, M.; MELIS, M. P.; DEIANA, M.; COSENTINO, S. Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-9, 2014.

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

RAMOS, B.; MILLER, F. A.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Fresh fruits and vegetables – an overview on applied methodologies to improve its quality and safety. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 1–15, 2013.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 313–327, 2008.

REN, D.-Y.; LI, C.; QIN, Y.-Q.; YIN, R.-L.; DU, S.-W.; YE, F.; LIU, H.-F.; WANG, M.-P.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.-Y.; JIN, N.-Y. Lactobacilli Reduce Chemokine IL-8 Production in Response to TNF- α and Salmonella Challenge of Caco-2 Cells. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1–11, 2010.

RHIM, J.-W.; LEE, J. H.; NG., P. K. W. Mechanical and barrier properties of biodegradable based films coated with polylactic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 232-238, 2007.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; MOCTEZUMA, E.; GUITIERREZ-PACHECO, M. M.; TAPIA-RODRIGUEZ, M. R.; ORTEGA-RAMIREZ, L. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 3772-3778, 2016.

- ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 438–447, 2009.
- ROJAS-GRAÜ, M. A.; TAPIA, M. S.; MARTÍN-BELLOSO, O. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 139–147, 2008.
- ROMANO, N.; TAVERA-QUIROZ, M. J.; BERTOLA, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 560–566, 2014.
- SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; OLIVEIRA, R. P. DE S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; SAAVEDRA, J. I. Q.; CHIRALT, A. Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 5, p. 200-206, 2014.
- SANCHÍS, E.; GHIDELLI, C.; SHETH, C. C.; MATEOS, M.; PALOU, L.; PÉREZ-GAGO, M. B. Integration of antimicrobial pectin-based edible coating and active modified atmosphere packaging to preserve the quality and microbial safety of fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante). **Journal of the Science of Food Agriculture**, p. 97, v. 252–260, 2017.
- SANCHÍS, E.; GONZÁLEZ, S.; GHIDELLI, C.; SHETH, C. C.; MATEOS, M.; PALOU, L.; PÉREZ-GAGO, M. B. Browning inhibition and microbial control in fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) by apple pectin-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 186-193, 2016.
- SCHIEBER, A. Functional Foods and Nutraceuticals. **Food Research International**, v. 46, p. 436, 2012.
- SIEZEN, R. J.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E. T. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-13, 2011.
- SILVA, E. O.; PINTO, P. M.; JACOMINO, A. P.; SILVA, L. T. **Processamento Mínimo de Produtos Hortifrutícolas**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.
- SMOKVINA, T.; WELS, M.; POLKA, J.; CHERVAUX, C.; BRISSE, S.; BOEKHORST, J.; VLIEG, J. E. T. VAN H.; SIEZEN, R. J. *Lactobacillus paracasei* Comparative Genomics: Towards Species Pan-Genome Definition and Exploitation of Diversity. **Plos One**, v. 8, p. 1-18, 2013.
- SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; MACNAUGHTAN, W.; PARMENTER, C.; FISK, I. D. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in

edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 345-355, 2017.

SOUKOULIS, C.; SINGH, P.; MACNAUGHTAN, W.; PARMENTER, C.; FISK, I. D. Compositional and physicochemical factors governing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG embedded in starch-protein based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 876-887, 2016.

SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; GAN, H.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; PARMENTER, C.; FISK, I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 231-242, 2014a.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; YONEKURA, L.; PARMENTER, C.; FISK, I. D. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. **Food Chemistry**, v. 159, p. 302-308, 2014b.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. The Use of Electric Fields for Edible Coatings and Films Development and Production: A Review. **Food Engineering Reviews**, v. 2, p. 244-255, 2010.

TAVERA-QUIROZ, M. J.; ROMANO, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; BERTOLA, N. Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 164-173, 2015.

THOMAS, A. B.; NASSUR, R. DE C. M. R.; BOAS, A. C. V.; LIMA, L. C. DE O. Revestimento com fécula de mandioca incorporada com própolis nos compostos bioativos em morangos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, p. 87-96, 2016.

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.

VALDÉS, A.; RAMOS, M.; BELTRÁN, A.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. State of the Art of Antimicrobial Edible Coatings for Food Packaging Applications: Review. **Coatings**, v. 7, p. 1-23, 2017.

VALDÉS, A.; BURGOS, N.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. Review: Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. **Coatings**, v. 5, p. 865-886, 2015.

VENTIMIGLIA, G.; ALFONZO, A.; GALLUZZO, P.; CORONA, O.; FRANCESCA, N.; CARACAPPA, S.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 57-68, 2015.

VICENTINI, A.; LIBERATORE, L.; MASTROCOLA, D. Functional Foods: Trends and Development of the Global Market. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, p. 338-351, 2016.

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

WANG, J.; SHANG, J.; REN, F.; LENG, X. Study of the physical properties of whey protein: sericin protein-blended edible films. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 109–116, 2010.

WANG, J.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; YANG, Y.; YANG, Z. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 16-25, 2015.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. V.; KUMAR, A.; HARDWIDGE, P. R.; GOVIND, R.; TANAKA, T.; KONDO, A. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 279-288, 2016.

APÊNDICE

1. Delineamento experimental

No estudo da adição de micro-organismos probióticos em revestimento comestível à base de pectina de baixa metoxilação e sua aplicação em vegetais minimamente processados o delineamento experimental foi dividido em duas etapas.

O primeiro experimento consistiu do preparo dos revestimentos comestíveis e sua avaliação. Foi usado o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, onde nas parcelas foram avaliados os micro-organismos probióticos (*L. acidophilus* LA3, *L. plantarum* (CH6072 e L2860), *L. paracasei* BGP1, *L. acidophilus* LA3 em combinação com *L. plantarum* (CH6072 e L2860), *L. acidophilus* LA3 em combinação com *L. paracasei* BGP1 e *L. plantarum* (CH6072 e L2860) em combinação com *L. paracasei* BGP1) e nas subparcelas o tempo de armazenamento (0, 3, 6, 9, 12 dias após o processamento) (Figura 1).

Os revestimentos comestíveis foram armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenados em estufa incubadora tipo BOD a 4 °C. Durante o período de armazenamento foram realizadas as análises físicas (viscosidade, cor, índice de brancura e turbidez), químicas (pH) e microbiológicas (viabilidade das culturas probióticas, resistência gastrointestinal *in vitro* simulada e atividade antimicrobiana). A partir dos resultados obtidos nesta fase do experimento selecionou para a segunda etapa os revestimentos comestíveis que após a simulação do trato gastrointestinal *in vitro* apresentaram contagem total de células viáveis acima de 6,0 Log UFC mL⁻¹.

O segundo experimento consistiu da aplicação dos revestimentos comestíveis controle e contendo micro-organismos probióticos (*L. plantarum* (CH6072 e L2860), *L. paracasei* BGP1 e a combinação de *L. plantarum* (CH6072 e L2860) e *L. paracasei* BGP1) em cenoura e goiaba minimamente processadas. Esse experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado disposto em esquema de parcela subdividida, estando na parcelas a cenoura e a goiaba minimamente processada revestidas e na sub parcelas os tempos de armazenamento (0, 3, 6, 9 e 12 dias após o processamento para cenoura e 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após o processamento para goiaba) (Figura 2).

Os vegetais minimamente processados revestidos foram acondicionados em bandejas de polietileno e ambos foram armazenados em estufa incubadora tipo BOD a 4 °C. Durante o período de armazenamento foram realizadas as análises físicas

(microscopia eletrônica de varredura, perda de massa, firmeza e cor), químicas (pH, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis totais) e microbiológicas (fungos filamentosos e leveduras, bactérias psicrotófica, *Salmonella sp.*, viabilidade das culturas probióticas, resistência gastrointestinal *in vitro* simulada das bactérias probióticas e atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis contendo bactérias probióticas frente à *Listeria innocua* ATCC33090 e *Escherichia coli* ATCC11229).

Todo o experimento foi realizado em três repetições e as análises microbiológicas, físicas e químicas em duplicata.

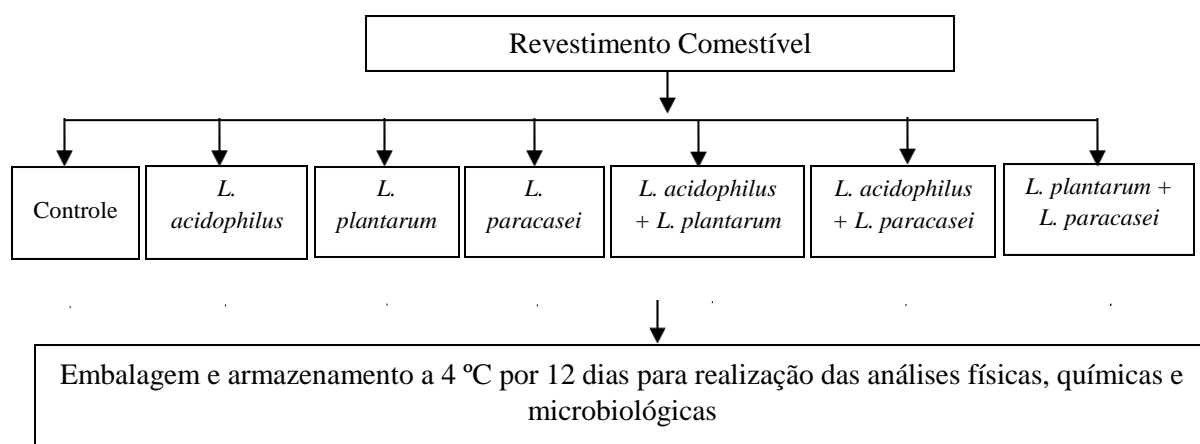


Figura 1 – Esquema da primeira etapa do experimento para avaliar os revestimentos comestíveis produzidos.

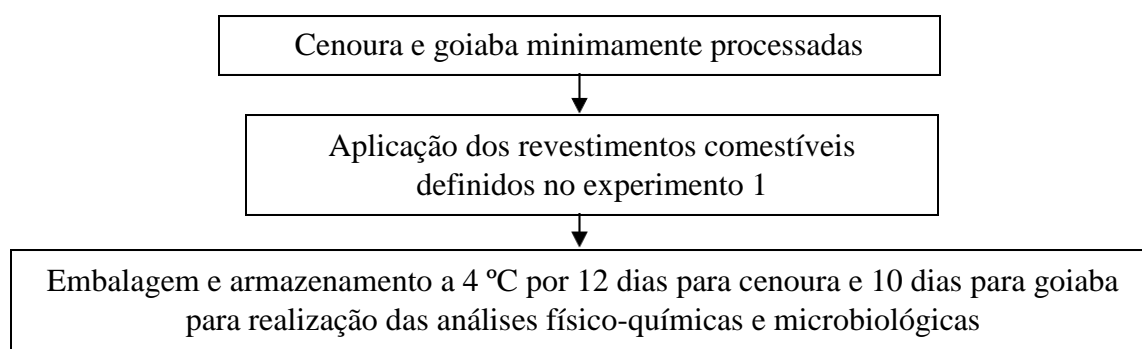


Figura 2 – Esquema do experimento para avaliar a atuação dos revestimentos comestíveis produzidos em vegetais minimamente processados (2ª etapa).

2. Análise Estatística

Para análise dos resultados foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado em parcelas subdivididas, onde na parcela foram avaliados os tratamentos e na subparcela o tempo de armazenamento.

Os dados obtidos na primeira etapa do experimento foram interpretados por análise de variância (ANOVA) utilizando teste F. Quando os resultados apresentaram diferença significativa pelo teste F entre as amostras foi utilizado teste de Tukey para comparação de médias (viabilidade das culturas probióticas, resistência gastrointestinal *in vitro* simulada, pH, viscosidade, cor, índice de brancura e turbidez) e quando o tempo apresentou influência sobre os tratamentos foi aplicado a análise de regressão (contagem total de células viáveis, pH, viscosidade), ambos ao nível de 5 % de probabilidade.

Para análise dos dados obtidos na segunda parte do experimento foi utilizado ANOVA. Na interpretação dos resultados de cenoura minimamente processada foi aplicado para comparação de médias entre os tratamentos o teste de Tukey para as análises de fungos filamentosos e leveduras, psicrotóficos, viabilidade das bactérias probióticas, atividade antimicrobiana, cor e índices de qualidade da cor e o teste T para as análises de fungos filamentosos e leveduras, psicrotróficos, acidez total titulável, pH, sólidos solúveis totais e, para avaliar a influência do tempo de armazenamento foi utilizado o teste de regressão (fungos filamentosos e leveduras, psicrotróficos, contagem total de células probióticas viáveis, contagem total de células viáveis resistentes ao trato gastrointestinal simulado, perda de massa e índice de brancura).

Já para interpretação dos resultados de goiaba minimamente processada foi realizada a ANOVA e aplicado para comparação de médias entre os tratamentos o teste de Tukey para as análises de viabilidade das bactérias psicrotróficas, atividade antimicrobiana, fungos filamentosos e leveduras, psicrotóficos, pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, perda de massa, firmeza, cor e índices de qualidade da cor e, para avaliar a influência do tempo de armazenamento sobre os tratamentos foi utilizado o teste de regressão para as análises de contagem total de células probióticas viáveis, contagem total de células viáveis resistentes ao trato gastrointestinal *in vitro* simulado, fungos filamentosos e leveduras, bactérias psicrotóficas, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis, perda de massa, firmeza, luminosidade.

Para a execução da análise estatística foi utilizado o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

CAPÍTULO 1

Digestão gastrointestinal simulada *in vitro* de revestimentos comestíveis a base de pectina contendo micro-organismos probióticos e avaliação da sua atividade frente a *Escherichia coli* e *Listeria innocua*

RESUMO

Foram elaborados revestimentos comestíveis a base de pectina de baixa metoxilação contendo *Lactobacillus acidophilus* LA3, *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1, *L. acidophilus* LA3 e *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. acidophilus* LA3 e *L. paracasei* BGP1 e *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1. Estes revestimentos e o revestimento controle (sem adição de probiótico) foram armazenados a 4 °C e avaliados quanto a viabilidade das culturas probióticas, a sobrevivência ao trato gastrointestinal simulado *in vitro*, atividade antimicrobiana frente *Listeria innocua* ATCC33090 e *Escherichia coli* ATCC11229 e as características físicas (viscosidade, cor, índice de brancura e turbidez) e química (pH) durante 12 dias. As bactérias probióticas de RLP, RLPA, RLALP e RLPLPA permaneceram viáveis nos revestimentos com contagens acima de 8,0 Log UFC mL⁻¹ durante o armazenamento. Todos os tratamentos apresentaram reduções da contagem de probióticos e apenas os revestimentos comestíveis RLP, RLALP e RLPLPA apresentaram contagem de células viáveis acima de 6,0 Log UFC mL⁻¹ após simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. Constatou-se atividade antimicrobiana frente a *L. innocua* ATCC33090 e *E. coli* ATCC11229 para os tratamentos RLP, RLALPA e RLPLPA durante os 12 dias de armazenamento. pH, cor, índice de brancura e turbidez foram significativamente alterados (p<0,05) pela incorporação dos micro-organismos, no entanto, a adição de culturas probióticas não influenciou (p>0,05) a viscosidade dos revestimentos comestíveis avaliados. Portanto, o revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação apresenta grande potencial para incorporação de culturas probióticas em vegetais.

Palavras-Chave: lactobacilos, resistência gastrointestinal, filme comestível, pectina de baixa metoxilação.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos consumidores sobre o impacto que os alimentos podem ocasionar na saúde contribuiu para uma elevada demanda por produtos alimentícios contendo ingredientes funcionalmente ativos (TRIPATHI; GIRI, 2014; KANMANI; LIM, 2013). São considerados alimentos funcionais aqueles consumidos como parte da dieta usual e que podem trazer benefícios fisiológicos específicos e/ou prevenir o risco de doenças crônicas (SCHIEBER, 2012).

Entre os ingredientes funcionais que vem chamando atenção dos pesquisadores estão os micro-organismos probióticos que, quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os benefícios dos probióticos são dependentes da dose diária ingerida, que varia de 6,0 – 9,0 Log UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ e da ingestão diária regular (LÓPEZ DE LACEY et al., 2012). A maioria das bactérias probióticas são pertencentes ao grupo das bactérias lácticas e sua funcionalidade é dependente de cada estirpe (KANMANI; LIM, 2013).

Pesquisadores estão desenvolvendo novas maneiras de adicionar aos alimentos culturas probióticas com benefícios potenciais à saúde (KANMANI; LIM, 2013). Assim, revestimentos comestíveis vêm sendo introduzidos como bons transportadores para a incorporação de vários compostos ativos em alimentos tais como, vitaminas, antioxidantes, probióticos e antimicrobianos (SOUKOULIS et al., 2014). Os revestimentos comestíveis são finas camadas de materiais biopoliméricos comestíveis aplicados à superfície dos alimentos, como frutas e hortaliças minimamente processadas, e que proporcionam barreira contra a migração da umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas e outros solutos (MISIR; BRISHTI; HOQUE, 2014). Muitos tipos de materiais poliméricos, tais como polissacarídeos, proteínas e lipídeos e ou a mistura deles têm sido utilizados no desenvolvimento de revestimentos comestíveis.

A pectina é um polissacarídeo, branco, amorfo e coloidal de alto peso molecular encontrada em frutas cítricas que apresenta propriedade espessante, emulsionante e capacidade de solidificar formando gel (VALDÉS et al., 2015). Sua estrutura consiste de moléculas de α -(1→4)-D-ácido galacturônico ligadas a um número pequeno de resíduos de ramnose na cadeia principal e arabinose, galactose e xilose nas cadeias laterais (KOHLI; GUPTA, 2015). O principal tipo de pectina utilizada na formulação de revestimento comestível é a de baixo grau de metoxilação devido a sua capacidade de formar géis firmes a pH baixo e na presença de cátions de cálcio e sem a necessidade da

adição de açúcar, promovendo maior firmeza e integridade estrutural além de reduzir a permeabilidade ao vapor de água (VALDÉS et al., 2015).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi elaborar revestimentos comestíveis à base de pectina de baixa metoxilação adicionados de bactérias probióticas e avaliar a viabilidade destes micro-organismos no revestimento produzido após simulação do trato gastrointestinal *in vitro* e sua atividade antimicrobiana frente a *Listeria innocua* e *Escherichia coli*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das culturas probióticas

Estirpes probióticas liofilizadas comerciais de *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Lactobacillus paracasei* BGP1 foram adquiridas da SACCO Brasil (Campinas, Brasil) e *Lactobacillus plantarum* (CH 6072 e L286) da Christian Hansen (Valinhos, Brasil).

As estirpes foram pré-ativadas, segundo Beristain-Bauza et al. (2016) com modificações, inoculando-se separadamente uma alçada de cada cultura em 50 mL de caldo Man Rogosa Sharpe – MRS (Acumedia, Brasil) sendo posteriormente incubadas a 37 °C por 16 horas. Em seguida, as culturas pré-ativadas individualmente foram transferidas assepticamente para 350 mL de caldo MRS e mantidas a 37 °C por 24 horas (*L. paracasei* BGP1 e *L. plantarum* (CH 6072 e L286)) e 48 horas (*L. acidophilus* LA3). Posteriormente, o meio de cultura foi centrifugado a 7000 g por 10 minutos e o *pellet* de células foi ressuspenso em água destilada estéril, obtendo uma concentração de 10,0 Log UFC mL⁻¹ de bactéria probiótica (determinada previamente) para inoculação no revestimento comestível.

2.2. Preparo do revestimento comestível adicionado de bactérias probióticas

Dispersões de pectina de baixa metoxilação LM-102 AS (CPKelco, Brasil) foram preparadas por dissolução de 3 % (w/v) de pectina em água destilada a 70 °C. O revestimento comestível foi obtido por mistura da dispersão de pectina, à temperatura ambiente, com 3 % (v/v) de Tween 40 (Sigma Aldrich, EUA) e 2 % (v/v) de glicerol (Vetec, Brasil) em agitador magnético (AGI 103, Nova Ética, Brasil), até completa dissolução. Em seguida, os revestimentos foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A cada 100 mL de revestimento foram

adicionados, diretamente, 1 mL de suspensão de células probióticas de modo a se obter 8,0 Log UFC mL⁻¹ no revestimento.

Foram obtidos os revestimentos comestíveis de pectina do tratamento controle e contendo micro-organismos probióticos (Tabela 1). Amostra controle foi preparada de acordo com o procedimento acima mencionado adicionando o mesmo volume de água destilada estéril sem a incorporação de célula probiótica. Para a obtenção das misturas foi adicionado uma concentração de 4,0 Log UFC mL⁻¹ de cada cultura probiótica.

Os revestimentos comestíveis de pectina do tratamento controle e adicionado de bactérias probióticas foram armazenados à 4 °C em frascos de vidro hermeticamente fechados e analisados logo após o processamento e nos tempos 3, 6, 9 e 12 dias.

Tabela 1 - Revestimentos de pectina incorporados com micro-organismos probióticos

Tratamentos	Micro-organismos
RC	Controle - Sem probiótico
RLA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
RLP	<i>Lactobacillus plantarum</i>
RLPA	<i>Lactobacillus paracasei</i>
RLALP	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i>
RLALPA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i>
RLPLPA	<i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i>

2.3. Caracterização dos revestimentos comestíveis

231. Viabilidade das culturas probióticas

A contagem padrão em placas das estirpes incorporadas nos revestimentos comestíveis foi determinada através da diluição de 10 mL de cada revestimento em 90 mL de solução salina peptonada (0,85 % NaCl e 0,1 % peptona). Foram realizadas diluições seriadas e 1 mL de cada diluição foi plaqueada pelo método *pour-plate* em ágar Man Rogosa Sharpe - MRS (Kasvi, Brasil). Após a solidificação adicionou-se uma sobrecamada de ágar MRS, e em seguida, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C durante 72 h (RICHER; VEDAMUTHU, 2001). Após o período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para determinar a população de bactéria probiótica no revestimento.

2.3.2. Resistência gastrointestinal simulada *in vitro*

A resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foi avaliada segundo Liserre et al. (2007) e Buriti, Castro e Saad (2010) com modificações. Dez mililitros de cada revestimento foram diluídos em 90 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 % e, em seguida, simulou-se as condições gastrointestinais. Retirou-se 10 mL da diluição anterior e adicionou-se 3,0 g L⁻¹ de pepsina (pepsina da mucosa do estômago de suíno, Sigma-Aldrich) e 0,9 mg L⁻¹ de lipase (amino lipase de *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich), e ajustou-se o pH para 2,3 - 2,6 com HCl 1N e incubou-se a 37 °C sob agitação de 150 rpm em banho-maria (Gyratory Water Bath Shaker G76D, New Brunswick Scientific CO, Inc. N. J., USA) durante 2 horas (fase gástrica). Na etapa seguinte, ajustou-se o pH para 5,4 - 5,7, com solução de fosfato de sódio pH 12 contendo bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina de pâncreas de suíno, Sigma-Aldrich) na proporção de 5,0 g L⁻¹ e 1,6 g L⁻¹, respectivamente. Reincubou-se as amostras a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 1). Em seguida, ajustou-se o pH para 6,8 - 7,2 utilizando solução de fosfato de sódio pH 12 contendo pancreatina (0,79 g L⁻¹) e bile (7,95 g L⁻¹). Reincubou-se novamente as amostras a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 2), totalizando 6 h de ensaio.

Ao término de cada fase do ensaio, alíquotas de 1 mL foram retiradas e submetidas às diluições seriadas com solução salina peptonada e plaqueadas pelo método *pour-plate* em ágar MRS. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C por 72 horas e posteriormente realizou-se a contagem das colônias (RICHER; VEDAMUTHU, 2001).

2.3.3. Determinação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis frente a *Listeria innocua* e *Escherichia coli*

A atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis frente à *L. innocua* ATCC33090 e *E. coli* ATCC11229 foi determinada de acordo com Acevedo-Fani et al. (2015) com modificações. As estirpes alvo foram inoculadas e repicadas por 2 vezes consecutivas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) a 37 °C durante 24 h, de maneira que a densidade celular final fosse 8,0 Log UFC mL⁻¹ (previamente determinada). Posteriormente, aproximadamente 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) foi vertido em placas de Petri e, após a sua solidificação, alíquotas de 0,1 mL de *L. innocua* e *E. coli* foram espalhadas, separadamente, sobre a superfície desse meio de cultura. Dois discos de papel (0,5 cm de diâmetro) incorporados, separadamente, nos

diferentes revestimentos comestíveis por 5 segundos foram colocados sobre a superfície da cultura. As placas foram incubadas durante 24 h a 35 °C para *L. innocua* e 48 h a 37 °C para *E. coli*. Os resultados foram avaliados por meio da formação de zonas de inibição que foram medidas com auxílio de paquímetro (530-104BR, Mitutoyo, Japão).

234. Viscosidade

A viscosidade foi determinada em viscosímetro capilar de Cannon-Fenske (CT-52, SCHOTT, Alemanha) de acordo com o manual de instruções do equipamento. Os revestimentos (10 mL) foram mantidos no capilar (20 µm de diâmetro) acoplado ao banho por 10 minutos antes das leituras, com o objetivo das amostras permanecerem a temperatura de 25 °C. Utilizou-se cronômetro (RS-008, Unilab, Brasil) com a finalidade de determinar o tempo de escoamento. As equações 1 e 2 foram usadas para determinar a viscosidade:

$$U = k \cdot t \quad (1)$$

Substituindo em:

$$\eta = U \cdot d \quad (2)$$

Em que:

t: tempo de escoamento (segundos)

k: constante (adimensional)

η: viscosidade (mPa.s)

d: densidade (g cm⁻³)

235. pH

A determinação do pH dos revestimentos comestíveis foi realizada utilizando medidor de pH digital (mPA-210, Tecnoyon, Brasil), através da imersão do eletrodo diretamente nas amostras (ELLIS, 2016).

236. Cor e Índice de brancura

A cor dos revestimentos foi determinada em colorímetro Color Quest H (Hunter lab, Reston, USA), em que um cristal de face plana contendo revestimento comestível foi colocado na parte superior do colorímetro. Foram realizadas leituras na escala CIELAB, coordenadas L*, a* e b*. Os valores dessas coordenadas foram utilizados para calcular o

índice de brancura durante o período de armazenamento de acordo com a equação 3 (VARGAS et al., 2008):

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^{*2} + b^{*2})} \quad (3)$$

Em que:

IB: índice de brancura;

L*: Luminosidade;

a*: coordenada a;

b*: coordenada b.

2.3.7. Turbidez

A turbidez dos revestimentos foi medida por absorvância a 600 nm em espectrofotômetro UV-visível (UV-1800, Shimadzu, Japão) (CHEN; ZHONG, 2015). As medições da turbidez foram feitas imediatamente após as amostras serem vigorosamente agitadas para deixá-las homogêneas.

2.4. Análise estatística

Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado em parcelas subdivididas, onde na parcela foram avaliados os tratamentos e na subparcela o tempo de armazenamento. Os dados obtidos foram interpretados por análise de variância (ANOVA) utilizando teste F, teste de Tukey para comparação de médias e análise de regressão ao nível de 5 % de probabilidade. Para isso foi utilizado o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Viabilidade e resistência gastrointestinal simulada *in vitro* dos micro-organismos probióticos nos revestimentos comestíveis à base de pectina

Embora não exista um consenso de informações sobre as contagens mínimas de bactérias probióticas para que seus benefícios sejam obtidos pelos consumidores, é comumente exigido que alimentos probióticos contenham no mínimo 6,0 Log UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ de células viáveis e cerca de 8,0-9,0 Log UFC alcancem o intestino grosso (KECHAGIA et al., 2013; MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2015). Os revestimentos comestíveis desenvolvidos apresentaram viabilidade acima de

6,0 Log UFC mL⁻¹ durante o período de armazenamento contendo, portanto, a quantidade mínima de células viáveis recomendada (Figura 1). Todos os revestimentos avaliados oferecem ao consumidor quantidade suficiente de bactérias probióticas para promover benefícios ao organismo hospedeiro desde que seja consumido diariamente e na dose correta.

Os revestimentos comestíveis RLP, RLPA, RLALP e RLPLPA apresentaram, durante o período de armazenamento, contagem padrão em placas de células viáveis acima de 8,0 Log UFC mL⁻¹ (Figura 1), 2 ciclos Log a mais que a concentração mínima recomendada, o que reduz a quantidade do produto necessária de ser ingerida diariamente para se obter os benefícios dos probióticos. Também foi constatado que o revestimento RLP apresentou a maior concentração de células probióticas viáveis sendo superior aos revestimentos RLPA, RLALP, RLALPA e RLPLPA em aproximadamente um 1 ciclo Log e ao revestimento RLA em, aproximadamente, 3 ciclos Log (Figura 1). Já o tratamento RLA apresentou a menor contagem de células viáveis com redução significativa ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento, chegando a contagem de 5,06 Log UFC mL⁻¹ após 12 dias de vida de prateleira do revestimento (Figura 1).

Em relação aos revestimentos contendo culturas mistas de micro-organismos (RLALP e RLPLPA), constatou-se que aqueles que continham *L. plantarum* (CH6072 e L286) apresentaram, aproximadamente, 1 ciclo Log a mais de células viáveis do que o revestimento RLALPA (Figura 1).

Diante dos resultados obtidos, constatou-se maior viabilidade e melhor adaptabilidade de *L. plantarum* (CH6072 e L286) no revestimento comestível a base de pectina desenvolvido. Alguns pesquisadores já demonstraram que *L. plantarum* é um micro-organismo adequado para a adição em produtos de origem vegetal (DI CAGNO et al., 2013; WOUTERS et al., 2013; PALOMINO et al., 2015; SIROLI et al., 2015), devido a este nicho ecológico ser seu *habitat* natural (SIEZEN; VAN HYLCKAMA VLIEG, 2011) e por sua capacidade de utilizar variados tipos de carboidratos (SABO et al., 2014; VENTIMIGLIA et al., 2015).

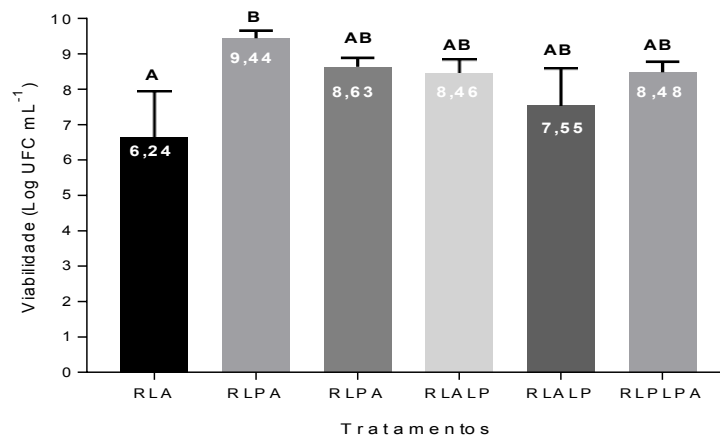


Figura 1 – Viabilidade de bactérias probióticas durante o período de estocagem (12 dias) dos diferentes revestimentos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. RLA: *L. acidophilus*, RLP: *L. plantarum*, RLPAT3: *L. paracasei*, RLALP: *L. acidophilus* e *L. plantarum*, RLALPA: *L. acidophilus* e *L. paracasei*, RLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

Alimentos probióticos devem ser, preferencialmente, armazenados a uma temperatura entre 4 e 5 °C (TRIPATHI; GIRI, 2014), visto que as condições ambientais de armazenamento são fatores muito importantes para garantir a sobrevivência celular (KANMANI et al., 2011). Verificou-se no presente estudo que, mesmo estando armazenado na temperatura ideal, o tempo de armazenamento a 4 °C apresentou influência significativa ($p < 0,05$) sobre a viabilidade das culturas probióticas dos revestimentos RLA, RLPA e RLALPA e, que todos os tratamentos avaliados, com exceção de RLA, mantiveram sua viabilidade celular acima de 6,0 Log UFC mL⁻¹ até o 12º dia de armazenamento a 4 °C (Figura 2).

Evidencia-se mais uma vez o potencial de *L. plantarum* (CH6072 e L286), pois os tratamentos (RLP, RLALP e RLPLPA) em que este micro-organismo está presente não sofreram redução ($p < 0,05$) na contagem de bactérias probióticas ao longo do tempo de armazenamento. A maior sobrevivência de *L. plantarum* pode ser devida a sua capacidade de se adaptar a diferentes ambientes e de utilizar variados tipos de carboidratos.

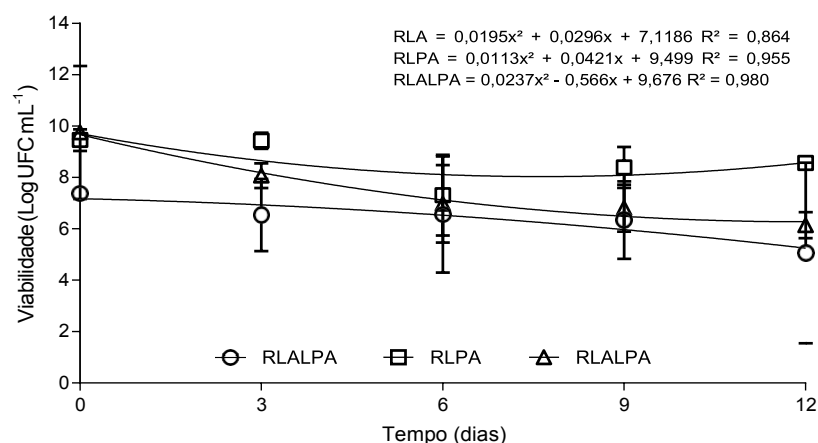


Figura 2 - Variação da contagem padrão em placas de células viáveis nos revestimentos RLA, RLPA e RLALPA ao longo do período de armazenamento refrigerado. RLA: *L. acidophilus*, RLPA: *L. paracasei*, RLALPA: *L. acidophilus* e *L. paracasei*. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3).

Segundo Mitsuoka (2014), as bactérias probióticas devem estar ativas no produto, sobreviver ao longo do trato digestivo, resistir aos ácidos, sais biliares, enzimas e oxigênio, sendo capazes de agregar-se como parte da microbiota natural e apresentar efeitos benéficos após aderirem ao intestino do hospedeiro. No presente estudo, constatou-se que somente os revestimentos RLP, RLALP e RLPLPA apresentaram contagem média de células viáveis acima de 6,0 Log UFC mL⁻¹ após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais durante 12 dias de armazenamento (Figura 3), chegando ao 12º dia com populações necessárias para promover benefícios ao consumidor. Ferrando et al. (2016), também constataram que estirpes de *L. plantarum* (Lp 813 e Lp 998) apresentaram boa resistência a passagem pelo trato gastrointestinal simulado apresentando uma redução na contagem de células viáveis de, aproximadamente, 3 ciclos Log.

Os revestimentos que apresentaram boa resistência das bactérias probióticas após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais tinham em comum a cultura de *L. plantarum* (CH6072 e L286) evidenciando mais uma vez o uso desta estirpe para veiculação por revestimentos comestíveis e aplicação em alimentos de origem vegetal.

O potencial promissor do uso de *L. plantarum* como probiótico em alimentos se deve ao fato de algumas cepas apresentarem boa resistência a passagem pelo trato gastrointestinal através da adaptação e sobrevivência a baixos valores de pH (TURCHI et al., 2013), presença do gene BSH e sua expressão com produção de hidrolase salina biliar conferindo resistência aos sais biliares e resistência à ação das enzimas pancreáticas que

podem apresentar efeito sobre a parede celular ou componentes de membrana que afetam sua atividade ou viabilidade (FERRANDO et al., 2016).

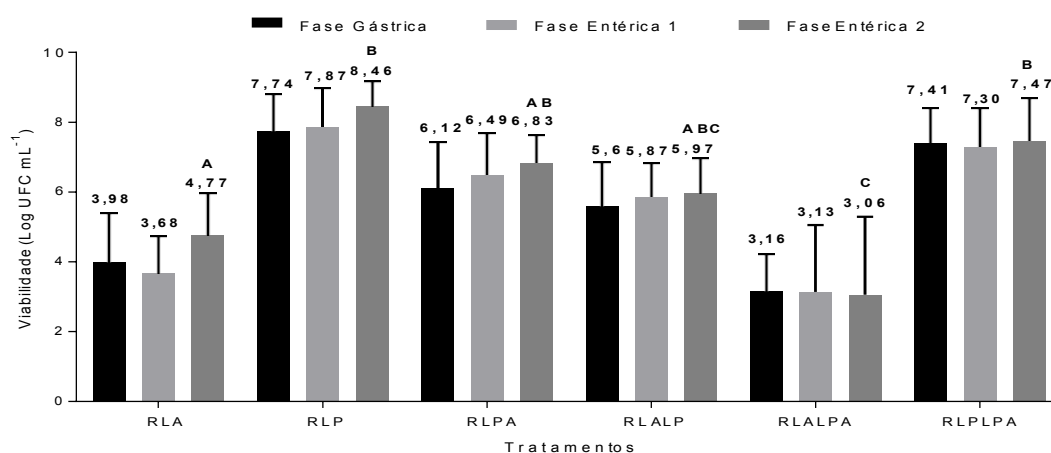


Figura 3 - Contagem padrão em placas de células viáveis após simulação do trato gastrointestinal *in vitro* durante o período de estocagem de 12 dias para os diferentes revestimentos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey na fase entérica 2. RLA: *L. acidophilus*, RLP: *L. plantarum*, RLPA: *L. paracasei*, RLALP: *L. acidophilus* e *L. plantarum*, RLALPA: *L. acidophilus* e *L. paracasei*, RLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

3.2. Atividade antimicrobiana dos revestimentos frente à *E. coli* e *L. innocua*

Verificou-se que os revestimentos comestíveis de pectina de baixa metoxilação adicionados das estirpes de *Lactobacillus*, com exceção de *L. acidophilus* LA3 (RLA), mostraram efeitos antagonistas sobre *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 (Tabela 2) e, que o período de armazenamento dos revestimentos comestíveis não apresentou influência ($p > 0,05$) sobre a atividade antimicrobiana.

O grau de antagonismo foi dependente das estirpes probióticas e indicadoras, no entanto, constatou-se um maior espectro de atuação sobre *L. innocua* (Tabela 2). O maior grau de inibição de *L. innocua* se deve ao fato da maioria das bacteriocinas atuarem sobre espécies bacterianas estreitamente relacionadas ao micro-organismo produtor da bacteriocina (SABO et al., 2014; OVCHINNIKOV et al., 2016) uma vez que, as estas atuam interrompendo a integridade da membrana das células sensíveis acarretando o vazamento de solutos intracelulares e, eventualmente, morte celular (OVCHINNIKOV et al., 2016). Essa interação também é responsável pela inatividade da maioria das bacteriocinas em direção as cepas bacterianas gram-negativas (PEREZ; PEREZ; ELEGADO, 2015).

Os revestimentos controle e RLA não inibiram os micro-organismos indicadores avaliados (Tabela 2). Já os revestimentos RLP, RLPA, RLALP, RLALPA e RLPLPA

apresentaram inibição do crescimento de *L. innocua* ATCC33090, enquanto os revestimentos RLP, RLPA, RLALPA e RLPLPA apresentaram atividade antimicrobiana frente à *E. coli* ATCC11229 (Tabela 2), podendo ser observado através da produção de uma zona de inibição clara em torno do revestimento. Essa zona de inibição se deve a difusão dos compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias probióticas presentes nos revestimentos comestíveis para o meio sólido.

Os revestimentos RLP e RLPLPA foram os que apresentaram o maior antagonismo e que foram capazes de inibir *L. innocua* ATCC33090 e *E. coli* ATCC11229 (Tabela 2), evidenciando mais uma vez o potencial promissor da utilização de *L. plantarum* em revestimentos comestíveis bem como sua adição em produtos minimamente processados. A maior atividade antimicrobiana de *L. plantarum* se deve ao fato desse micro-organismo ser capaz de produzir, pelo menos, 6 (seis) bacteriocinas, tais como Plantaricina EF, Plantaricina W, Plantaricina JK e Plantaricina S (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

A atividade antimicrobiana dos lactobacilos estudados pode ser explicada pela capacidade destas culturas em produzir ácidos que promovem a redução do pH e, conseqüentemente, a criação de condições desfavoráveis para o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (MARTINS et al., 2015). Este fato fica evidenciado após a constatação de que os revestimentos comestíveis que apresentaram pH mais baixo (Tabela 3) foram os mesmos que exibiram zonas de inibição frente as bactérias indicadoras estudadas.

Tabela 2 – Inibição do crescimento de bactérias indicadoras pelas culturas probióticas adicionadas no revestimento comestível

Tratamento	Micro-organismos indicadores	
	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	<i>E.coli</i> ATCC 11229
Controle	-	-
RLA (<i>L. acidophilus</i>)	-	-
RLP (<i>L. plantarum</i>)	+++	+
RLPA (<i>L. paracasei</i>)	+	±
RLALP (<i>L. acidophilus</i> e <i>L. plantarum</i>)	+	-
RLALPA (<i>L. acidophilus</i> e <i>L. paracasei</i>)	++	+
RLPLPA (<i>L. plantarum</i> e <i>L. paracasei</i>)	+++	+

Diferentes pontuações refletem os diferentes graus de inibição do crescimento expresso em mm.

(-) Sem inibição.

(++) zona de inibição entre 16 e 18 mm.

(±) ≤ 10 mm de inibição, mas sem um halo claro.

(+++) zona de inibição ≥ 19 mm.

(+) zona de inibição entre 11 e 15 mm.

3.3. Caracterização física e química dos revestimentos comestíveis

Constatou-se que o pH inicial dos revestimentos comestíveis adicionados ou não de bactérias probióticas foi 3,81 e, a adição das culturas probióticas não alterou ($p>0,05$) o pH dos revestimentos. Isso também foi observado por Piermaria et al. (2015) avaliando soluções para formação de filmes comestíveis a base de polissacarídeo kefirano adicionado de *L. plantarum* e *Kluyveromyces marxianus*.

No presente estudo, também foi observado que os valores médios de pH durante todo o período de armazenamento diferiram significativamente ($p<0,05$). Os tratamentos RLP e RLPA apresentaram os menores valores de pH (Tabela 3) e, o tempo de armazenamento influenciou ($p<0,05$) o pH dos tratamentos RLP, RLPA, RLALP e RLPLPA (Figura 4).

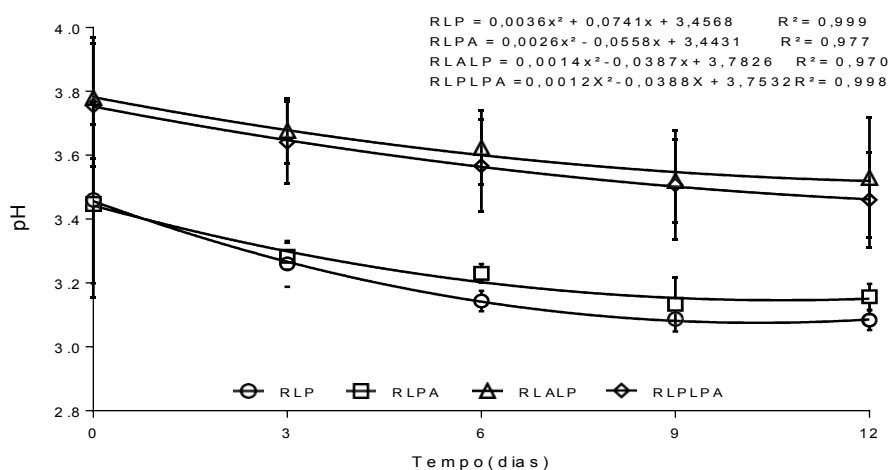


Figura 4 - Variação do pH dos revestimentos RLP, RLPA, RLALP e RLPLPA armazenados por 12 dias a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). RLP: *L. plantarum*, RLPA: *L. paracasei*, RLALP: *L. acidophilus* e *L. plantarum* e RLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

Tabela 3 – Valores médios de pH, viscosidade, cor, índice de brancura e turbidez dos revestimentos avaliados ao longo do período de armazenamento refrigerado

Revestimentos	pH	Viscosidade (m.Pas)	Cor			Índice de Brancura	Turbidez
			L*	a*	b*		
Controle	3,87 ± 0,07 a	5,33 ± 0,93 a	72,74 ± 0,88 a	2,46 ± 0,33 a	12,10 ± 0,92 a	70,06 ± 1,05 a	0,252 ± 0,01 a
RLA	3,70 ± 0,09 ab	4,69 ± 1,23 a	58,45 ± 1,17 b	1,70 ± 0,21 b	9,16 ± 0,68 bc	57,41 ± 1,07 b	0,860 ± 0,22 ab
RLP	3,21 ± 0,19 c	6,56 ± 1,72 a	57,31 ± 1,42 b	3,05 ± 0,68 c	8,40 ± 0,89 c	56,37 ± 1,42 b	1,747 ± 0,36 c
RLPA	3,25 ± 0,14 c	6,16 ± 1,32 a	63,34 ± 2,73 b	1,88 ± 0,27 bd	11,15 ± 0,66 ab	58,69 ± 2,66 b	1,855 ± 0,47 c
RLALP	3,63 ± 0,16 b	4,82 ± 1,66 a	65,81 ± 3,29 ab	1,92 ± 0,32 bd	11,33 ± 0,71 ab	64,00 ± 2,94 ab	0,869 ± 0,10 ab
RLALPA	3,75 ± 0,13 ab	4,46 ± 1,24 a	65,86 ± 4,28 ab	1,97 ± 0,38 d	11,05 ± 0,91 ab	61,57 ± 3,81 ab	0,802 ± 0,18 ab
RLPLPA	3,59 ± 0,17 b	4,73 ± 1,44 a	59,48 ± 4,30 b	2,59 ± 0,35 a	7,59 ± 1,34 c	63,90 ± 3,81 ab	1,052 ± 0,12 b

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). RLA: *L. acidophilus*, RLP: *L. plantarum*, RLPA: *L. paracasei*, RLALP: *L. acidophilus* e *L. plantarum*, RLALPA: *L. acidophilus* e *L. paracasei*, RLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

A viscosidade dos revestimentos comestíveis com ou sem a adição das estirpes probióticas variou de 4,46 a 6,56 m.Pas, a 25 °C, entre os diferentes tratamentos (Tabela 3), não havendo diferença ($p>0,05$) entre eles. Portanto, a presença dos microorganismos não alterou ($p>0,05$) a viscosidade dos revestimentos. Entretanto, o tempo de armazenamento influenciou a viscosidade dos revestimentos RLP e RLPA (Figura 5), havendo um aumento da viscosidade ao longo da vida de prateleira, que pode ser explicado pelo fato desses dois tratamentos terem sofrido uma maior redução do pH, que se aproximou do pH ótimo de geleificação da pectina, provocando o aumento da viscosidade.

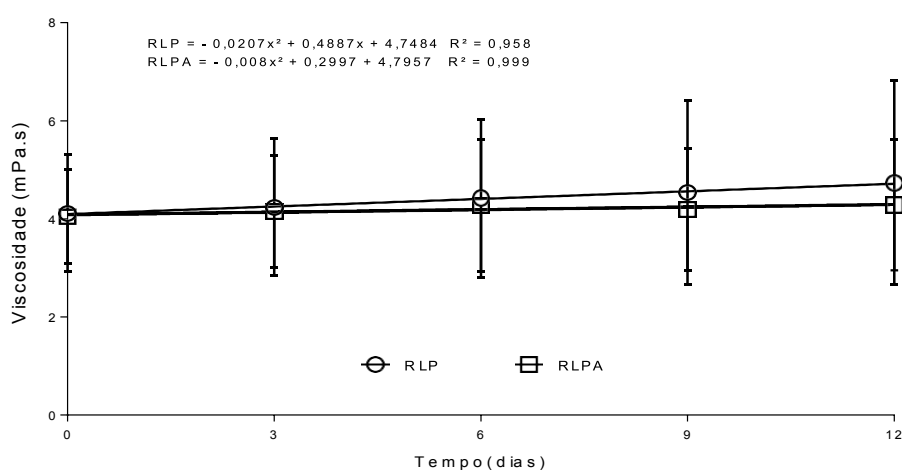


Figura 5 - Variação da viscosidade dos tratamentos RLP e RLPA ao longo do armazenamento a 4 °C por 12 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). RLP: *L. plantarum* e RLPA: *L. paracasei*.

A cor e as propriedades ópticas podem afetar diretamente a preferência dos consumidores bem como a escolha do produto e, por isso, são características importantes que devem ser avaliadas nos revestimentos comestíveis (SOUKOULIS et al., 2014). No presente estudo constatou-se que a Luminosidade (L^*) do revestimento controle diferiu ($p<0,05$) dos revestimentos RLA, RLP, RLPA e RLPLPA, sendo o revestimento controle o que apresentou-se mais claro por possuir maior luminosidade. Para a coordenada a^* (variação de vermelho a verde) todos os revestimentos comestíveis apresentaram tonalidade de vermelho pouco intensa. Quando avaliada a coordenada b^* (tonalidades de amarelo a azul) verificou-se que todos os tratamentos apresentaram tonalidade pouco intensa de amarelo. O período de armazenamento não apresentou influência ($p>0,05$) sobre os tratamentos avaliados para os parâmetros L^* , a^* e b^* .

Os revestimentos comestíveis avaliados apresentaram aparência visual similar. No entanto, as medições de índice de brancura (Tabela 3) mostraram diferença ($p < 0,05$), sendo que os revestimentos RLA, RLP e RLPA apresentaram os menores índices de brancura e o revestimento controle apresentou o maior índice de brancura. Segundo Acevedo-Fani et al. (2015), o índice de brancura tende a ser mais elevado quanto maior for a dispersão da luz. Portanto, verificou no presente estudo que o índice de brancura dos revestimentos diminuiu ($p < 0,05$) após a adição da cultura probiótica (Tabela 3), o que pode ter ocorrido devido a uma menor dispersão da luz por estas amostras, uma vez que a adição dos micro-organismos aumenta a concentração de partículas dispersas pelo revestimento comestível.

Além disso, observou-se que todas as amostras apresentaram-se opacas e com elevada turbidez após a homogeneização. As amostras RLP e RLPA apresentaram maior turbidez diferenciando-se ($p < 0,05$) de todas as outras amostras avaliadas. Já o tratamento controle apresentou a menor ($p < 0,05$) turbidez, demonstrando que a adição dos micro-organismos aumentou a turbidez dos revestimentos comestíveis (Tabela 3). Também foi constatada visualmente a separação de fases após armazenamento em repouso, com formação de uma camada de sedimentação no fundo do recipiente.

4. CONCLUSÃO

O revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação apresenta-se como um bom veículo de *L. acidophilus* LA3, *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1. As culturas de *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a combinação *L. plantarum* e *L. paracasei* além da sobrevivência dos micro-organismos nas condições estabelecidas no estudo apresentaram resistência ao trato gastrointestinal *in vitro* simulado. As bactérias probióticas, com exceção de *L. acidophilus*, adicionadas ao revestimento comestível apresentam atividade antimicrobiana frente à *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090. Entretanto, a presença desses micro-organismos no revestimento comestível ocasiona variação nas suas propriedades físicas e químicas.

Pode-se considerar o revestimento comestível estudado como uma matriz promissora para incorporar as bactérias probióticas, devendo ser testado seu uso em frutas e hortaliças. Destaca-se *L. plantarum* como um micro-organismo probiótico promissor para a adição em revestimentos comestíveis, por apresentar excelente viabilidade celular

e boa resistência ao trato gastrointestinal simulado, quando adicionada no revestimento de pectina de baixa metoxilação.

5. REFERÊNCIAS

ACEVEDO-FANI, A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168-177, 2015.

BERISTAIN-BAUZA, S. C.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.

CHEN, H.; ZHONG, Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 593-602, 2015.

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

ELLIS, C. Vegetable Products, Processed. In: JATIMER JR., G. W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international**. 20. ed. Rockville, USA: AOAC International, ch. 42, p. 1-14, 2016.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**. Working Group Report, 2002.

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

KANMANI, P.; LIM, S. T. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1041–1049, 2013.

KANMANI, P.; SATISH KUMAR, R.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate/chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 1106–1114, 2011.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 279–285, 2015.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1–16, 2007.

LÓPEZ DE LACEY, A. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 277–282, 2012.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; RODRIGUES, M. Z. Research and Development of Probiotic Products from Vegetable Bases: A New Alternative for Consuming Functional Food. In: R. V. V. RAVISHANKAR; A. B. JAMUNA (Org.), **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods**. Raton: Taylor & Francis Group, p. 207-222, 2015.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. DE O.; MARTINS, J. M. Products of Vegetable Origin: A New Alternative for the Consumption of Probiotic Bacteria. **Food Research International**. v. 51, p. 764-770, 2013.

MISIR, J.; BRISHTI, F. H.; HOQUE, M. M. Aloe vera gel as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits: A Review. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 2, p. 93-97, 2014.

MITSUOKA, T. Development of functional foods. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, p. 117-128, 2014.

OVCHINNIKOV, K. V.; CHI, H.; MEHMETI, I.; HOLO, H.; NES, I. F.; DIEP, D. B. Novel Group of Leaderless Multi-peptide Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 15, p. 5216-5224, 2016.

PALOMINO, J. M.; ÁRBOL, J. T. DEL; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A.; PULIDO, R. P. Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 788-794, 2015.

PEREZ, R. H.; PEREZ, M. T. M.; ELEGADO, F. B. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. **International Journal of Philippine Science and Technology**, v. 8, p. 61-67, 2015.

PIERMARIA, J.; DIOSMA, G.; AQUINO, C.; GARROTE, G.; ABRAHAM, A. Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 193–199, 2015.

RICHER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4. ed., Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 483-496, 2001.

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

SCHIEBER, A. Functional Foods and Nutraceuticals. **Food Research International**, v. 46, p. 436, 2012.

SIEZEN, R. J.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E. T. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-13, 2011.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D. I.; TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 74-84, 2015.

SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; GAN, H.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; PARMENTER, C.; FISK, I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 231-242, 2014.

TURCHI, B.; MANCINI, S.; FRATINI, F.; PEDONESE, F.; NUVOLONI, R.; BERTELLONI, F.; EBANI, V. V.; CERRI, D. Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1913–1922, 2013.

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.

VALDÉS, A.; BURGOS, N.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. Review: Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. **Coatings**, v. 5, p. 865-886, 2015.

VARGAS, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1146-1152, 2008.

VENTIMIGLIA, G.; ALFONZO, A.; GALLUZZO, P.; CORONA, O.; FRANCESCA, N.; CARACAPPA, S.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 57-68, 2015.

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 of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3352–3361, 2013.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012.

CAPÍTULO 2

Adição de revestimento comestível contendo culturas probióticas em cenoura minimamente processada sem alteração das características microbiológica, físicas e químicas

RESUMO

Objetivou-se elaborar cenoura minimamente processada recoberta com revestimento comestível de pectina de baixa metoxilação contendo *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286), *Lactobacillus paracasei* BGP1 e a combinação *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1. As cenouras minimamente processadas recobertas com revestimento comestível contendo ou não probióticos e *in natura* foram armazenadas a 4 °C e avaliadas quanto a qualidade microbiológica (fungos filamentosos e leveduras, bactérias psicotróficas e *Salmonella*), viabilidade das bactérias probióticas, sobrevivência das culturas probióticas ao trato gastrointestinal simulado *in vitro*, microscopia eletrônica de varredura, atividade antimicrobiana frente à *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 e as características físicas (perda de massa, firmeza e cor) e químicas (acidez total titulável, pH e teor de sólidos solúveis totais) durante 12 dias. Após a secagem do revestimento sobre a superfície das fatias de cenoura minimamente processada obteve-se um produto de aspecto visual semelhante ao produto sem revestimento. O armazenamento refrigerado das cenouras minimamente processadas recobertas causou uma redução na contagem das bactérias probióticas de aproximadamente 2,0 Log UFC g⁻¹ após 12 dias de armazenamento. A simulação *in vitro* das condições gastrointestinais reduziu a contagem de células viáveis em torno de 2,5 Log UFC g⁻¹ no decorrer da vida de prateleira. Comparando a viabilidade antes e após a digestão *in vitro* verificou que *L. paracasei* BGP1 sofreu uma maior redução da viabilidade (27,54%). As cenouras minimamente processadas recobertas com revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação contendo ou não bactérias probióticas não sofreram alteração (p>0,05) nas características microbiológicas, físicas e químicas. Cenoura minimamente processada contendo o revestimento comestível é um meio de carrear bactérias probióticas ao consumidor, sendo uma alternativa para o consumo de probióticos em matriz não láctea.

Palavras-Chave: probiótico, pectina, minimamente processados, alimentos probióticos, digestão gastrointestinal, microscopia eletrônica de varredura.

1. INTRODUÇÃO

De modo geral, revestimentos comestíveis são utilizados em frutas e hortaliças minimamente processadas como uma estratégia de barreira a contaminação microbiana e para reduzir os danos ocasionados pelo processamento (MOREIRA; ROURA; PONCE, 2011). Esses revestimentos contribuem para estender a vida de prateleira, uma vez que atuam como barreira semi-permeável reduzindo a perda de água e migração de solutos, reduzem a troca gasosa e a velocidade de reações de oxidação e até mesmo suprimem distúrbios fisiológicos como alterações de cor ou sabor de um produto (ALDANA et al., 2015). Além disso, os revestimentos comestíveis são apresentados como uma alternativa para veicular micro-organismos probióticos em alimentos onde eles não podem ser incorporados por inoculação direta e apresentam-se como uma via promissora para proteger esses micro-organismos das condições de processamento dos alimentos e condições do trato gastrointestinal (SOUKOULIS et al., 2014).

Probióticos são organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas ($6,0 - 7,0 \text{ Log UFC g}^{-1}$ ou mL^{-1}) conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002) específicos a cada estirpe. Os probióticos são consumidos majoritariamente em produtos lácteos (VICENTINI; LIBERATORE; MASTROCOLA, 2016), entretanto, a demanda de produtos probióticos não lácteos tem aumentado devido a intolerância à lactose e outros fatores relacionados ao consumo de produtos derivados do leite (BETORET et al., 2012) o que torna as pesquisas para o desenvolvimento de produtos probióticos a partir de matrizes não lácteas, incluindo as frutas e hortaliças, cada vez mais promissoras (MARTINS et al., 2013).

As frutas e hortaliças são componentes essenciais da dieta humana e existem evidências dos seus benefícios à saúde, podendo ser utilizadas como uma ferramenta importante para prevenir algumas doenças degenerativas. Como o consumo de frutas e hortaliças é um hábito bem estabelecido em todo o mundo, estes produtos representam uma matriz apropriada para veicular bactérias probióticas aos consumidores.

No entanto, para o desenvolvimento de frutas e hortaliças prontas para o consumo contendo probióticos, diferentes desafios devem ser superados, como a forma de adicionar o probiótico ao material vegetal e a perda de viabilidade devido as condições

de processamento e estocagem. Além disso, as características do vegetal como textura, cor, sabor e aroma não podem ser desconsideradas uma vez que, a perda dessas propriedades, mesmo quando os probióticos são viáveis, podem levar a uma rejeição do produto pelo consumidor.

Dessa forma, o presente estudo objetivou aplicar revestimentos comestíveis a base de pectina de baixa metoxilação adicionados de culturas probióticas em fatias de cenouras armazenadas sob refrigeração e avaliar as características microbiológicas, físicas, químicas, microscópicas e a resistência das estirpes ao trato gastrointestinal *in vitro* simulado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção e processamento mínimo de cenouras

Cenouras de tamanho similar ($15,0 \pm 2,0$ cm) foram selecionadas e classificadas com base na forma, cor ($L^* 60,0 \pm 2,0$, valor $a^* 22,0 \pm 2,0$) e ausência de defeitos visuais. As cenouras foram lavadas em água corrente a 5°C e, em seguida, mergulhadas em solução clorada (Sumaveg[®]) a 200 mg L⁻¹ durante 20 minutos, sendo então enxaguadas com solução clorada (Sumaveg[®]) a 20 mg L⁻¹ por 5 min. Posteriormente, as cenouras foram descascadas e fatiadas em rodela de, aproximadamente, 0,5 cm e foram divididas aleatoriamente em cinco lotes de 800 gramas para cada revestimento.

2.2. Preparo das culturas probióticas

Estirpes probióticas liofilizadas comerciais de *Lactobacillus paracasei* BGP1 foi adquirida da SACCO Brasil (Campinas, Brasil) e *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286) da Christian Hansen (Valinhos, Brasil).

As estirpes foram pré-ativadas, segundo Beristain-Bauza et al. (2016) com modificações, inoculando-se separadamente uma alçada de cada cultura em 50 mL de caldo Man Rogosa Sharpe – MRS (Acumedia, Brasil) sendo posteriormente incubadas a 37 °C por 16 horas. Em seguida, as culturas pré-ativadas individualmente foram transferidas assepticamente para 350 mL de caldo MRS e mantidas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi centrifugado a 7000 g por 10 minutos e o *pellet* de células foi ressuspendido em água destilada estéril, obtendo uma concentração de 10,0 Log UFC mL⁻¹ de bactéria probiótica (determinada previamente), para inoculação no revestimento comestível.

2.3. Preparo do revestimento comestível adicionado de bactérias probióticas

Dispersões de pectina de baixa metoxilação LM-102 AS (CPKelco, Brasil) foram preparadas por dissolução de 3 % (w/v) de pectina em água destilada a 70 °C. O revestimento comestível foi obtido por mistura da dispersão de pectina, à temperatura ambiente, com 3 % (v/v) de Tween 40 (Sigma Aldrich, EUA) e 2 % (v/v) de glicerol (Vetec, Brasil) em agitador magnético (AGI 103, Nova Ética, Brasil), até completa dissolução. Em seguida, os revestimentos comestíveis foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A cada 100 mL de revestimento foram adicionados, diretamente, 1 mL de suspensão de células probióticas de modo a se obter 8,0 Log UFC mL⁻¹ no revestimento.

Foram obtidos os revestimentos comestíveis de pectina do tratamento controle e contendo micro-organismos probióticos, *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1. Amostra controle foi preparada de acordo com o procedimento acima mencionado adicionando o mesmo volume de água destilada estéril sem a incorporação de célula probiótica. Para a obtenção das misturas foi adicionado uma concentração de 4,0 Log UFC mL⁻¹ de cada cultura probiótica.

2.4. Aplicação do revestimento comestível em cenoura minimamente processada

As cenouras minimamente processadas foram mergulhadas durante 3 minutos nos revestimentos controle, contendo *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1, e a mistura de *L. plantarum* (CH6072 e L286) com *L. paracasei* BGP1 e drenadas por 1 minuto. Em seguida, as cenouras minimamente processadas recobertas foram submergidas durante 1 minuto em solução de cloreto de cálcio 1 % para a formação do gel de pectina. As cenouras minimamente processadas revestidas foram secas em secador de bandejas (PD-150, Poldryer, Brasil) com circulação de ar de 1 m s⁻¹ a uma temperatura de 35 °C. Para o tratamento *in natura* foi realizado apenas a sacagem da cenoura minimamente processada. As cenouras minimamente processadas revestidas ou não (Tabela 1) foram acondicionadas em bandejas de polipropileno e armazenadas a 4 °C durante 12 dias.

Tabela 1 – Cenouras minimamente processadas adicionadas ou não revestimento comestível

Tratamentos	Revestimentos
CIN	<i>In natura</i>
CRC	Controle - Sem probiótico
CRLP	<i>Lactobacillus plantarum</i>
CRLPA	<i>Lactobacillus paracasei</i>
CRLPLPA	<i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i>

2.5. Caracterização do produto

Para analisar as alterações ocorridas durante o armazenamento as amostras foram avaliadas logo após o processamento e a cada 3 dias durante 12 dias de vida de prateleira.

25.1. Avaliação da qualidade microbiológica de cenoura minimamente processada

Contagens de bactérias psicotróficas, *Salmonella* sp. e fungos filamentosos e leveduras em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos foram determinadas ao longo do armazenamento refrigerado.

Para a determinação de bactérias psicotróficas e fungos filamentosos e leveduras porções de 25 gramas de cada amostra, CIN, CRC, CRLP, CRLPA, CRLPLPA, em condições assépticas foram colocadas em saco plástico estéril. Em seguida, 225 mL de solução salina peptona (0,1 g de peptona + 0,85 g de NaCl em água destilada) foram adicionadas e homogeneizadas durante 1 minuto em *Stomacher* (Bag Mixer 400, Interscience, França). Diluições seriadas foram realizadas e 1 mL de cada diluição foi inoculado pelo método *pour plate* em ágar padrão para contagem (PCA) previamente preparado e as placas foram incubadas a 7 °C durante 10 dias para determinação de bactérias psicotróficas (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001) e, 0,1 mL de cada diluição foi espalhado sobre ágar batata dextrose (BDA) previamente preparado e incubados a 25 °C durante 7 dias para avaliação de fungos filamentosos e leveduras (DOWES; ITO, 2001).

Para determinação de presença/ausência de *Salmonella* sp., 25 g das amostras de cenoura minimamente processada foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada 1 % (Acumedia, Brasil) seguindo metodologia de Andrews et al. (2001). Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em Log UFC mL⁻¹.

2.5.2. Viabilidade das culturas probióticas nas cenouras minimamente processadas

A contagem padrão em placas das estirpes incorporadas nos revestimentos comestíveis aplicados em cenoura minimamente processada foi determinada através da diluição de 25 gramas de cada tratamento em 225 mL de solução salina peptonada (0,85 % NaCl e 0,1 % peptona). Foram realizadas diluições seriadas e 1 mL de cada diluição foi plaqueada pelo método *pour-plate* em ágar Man Rogosa Sharpe - MRS (Kasvi, Brasil). Após a solidificação adicionou-se uma sobrecamada de ágar MRS, e em seguida, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C durante 72 h (RICHER; VEDAMUTHU, 2001). Após o período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para determinar a população de bactéria probiótica no revestimento comestível.

2.5.3. Sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foi avaliada segundo Liserre et al. (2007) e Buriti, Castro e Saad (2010) com modificações. Vinte e cinco gramas de cada vegetal revestido foram diluídos em 225 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 % e, em seguida, simulou-se as condições gastrointestinais. Retirou-se 10 mL da diluição anterior e adicionou-se 3,0 g L⁻¹ de pepsina (pepsina da mucosa do estômago de suíno, Sigma-Aldrich) e 0,9 mg L⁻¹ de lipase (amino lipase de *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich), e ajustou-se o pH para 2,3 - 2,6 com HCl 1 N e incubou-se a 37 °C sob agitação de 150 rpm em banho-maria (Gyratory Water Bath Shaker G76D, New Brunswick Scientific CO, Inc. N. J., USA) durante 2 horas (fase gástrica). Na etapa seguinte, ajustou-se o pH para 5,4 - 5,7, com solução de fosfato de sódio pH 12 contendo bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina de pâncreas de suíno, Sigma-Aldrich) na proporção de 5,0 g L⁻¹ e 1,6 g L⁻¹, respectivamente. Reincubou-se as amostras a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 1). Em seguida, ajustou-se o pH para 6,8 - 7,2 utilizando solução de fosfato de sódio pH 12 contendo pancreatina (0,79 g L⁻¹) e bile (7,95 g L⁻¹). Reincubou-se novamente as amostras a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 2), totalizando 6 h de ensaio.

Ao término de cada fase do ensaio, alíquotas de 1 mL foram retiradas e submetidas às diluições seriadas com solução salina peptonada e plaqueadas pelo método *pour-plate*

em ágar MRS. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C por 72 horas e posteriormente realizou-se a contagem das colônias (RICHER; VEDAMUTHU, 2001).

254. Avaliação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis em cenoura minimamente processada frente à *Escherichia coli* e *Listeria innocua*

O preparo do inóculo ocorreu através da ativação por duas vezes consecutivas das culturas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), onde uma alçada de cada cultura foi diluída em 50 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C por 16 horas. Em seguida, essas culturas pré-ativadas foram transferidas assepticamente para 350 mL de caldo BHI e mantidas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, o caldo foi centrifugado a 7000 g por 10 minutos e o *pellet* de células obtido foi ressuscitado em água destilada estéril de forma a se obter 8,0 Log UFC mL⁻¹.

As fatias de cenoura minimamente processada foram imersas, separadamente, por 10 minutos nas soluções contendo *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090. Em seguida, as fatias de vegetais adicionadas das bactérias indicadoras foram recobertas com os revestimentos comestíveis controle e contendo culturas probióticas. A capacidade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis foi avaliada ao longo do armazenamento das cenouras minimamente processadas recobertas ou não através da contagem padrão em placas de *E. coli* em ágar Macconkey a 37°C por 48 horas e *L. innocua* em ágar Palcam a 37°C por 48 horas.

255. Avaliação da adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos adicionados nos revestimentos comestíveis aplicados sobre as fatias de cenoura

As cenouras minimamente processadas revestidas foram fatiadas em seções de 0,5 cm x 0,5 cm com, aproximadamente, 1 mm a 2 mm de espessura. Para realização da análise, a parte externa das fatias de cenoura ficaram voltadas em direção ao feixe de elétrons, de modo que o revestimento comestível ficasse em contato com o feixe de elétrons. Para a desidratação das amostras foram realizados tratamentos seriados em acetona, nas graduações de 30 °GL, 50 °GL, 70 °GL por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 minutos, em acetona 80 °GL, 90 °GL e 100 °GL. Os cortes das fatias de cenoura minimamente processada foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer – modelo CPD020, Balzers, Liechstenstein) para a desidratação total

e, então metalizados com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechstenstein) para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP Zeiss, Cambridge, Inglaterra) e registro das imagens.

*Nota: Não foi possível realizar a etapa de fixação das células nas amostras uma vez que, o revestimento comestível tem afinidade pela solução de glutaraldeído 50 % e se desprende dos vegetais minimamente processados.

25.6. Perda de Massa

Cinco fatias de cenoura de cada tratamento foram selecionadas aleatoriamente e pesadas no início da vida de prateleira e a cada 3 dias de armazenamento. A perda de massa foi calculada para cada tratamento e convertida em porcentagem por meio da divisão do peso após o armazenamento pelo peso inicial registrado.

25.7. Análise de Firmeza

A firmeza das amostras foi determinada em texturômetro TA-TX2 (Texture Technologies Corp./Stable Micro systems) com célula de carga de 5 Kg e sonda tipo agulha P/2N (2 mm de diâmetro). As amostras foram comprimidas na região do córtex e coração da cenoura, em 30 % da altura original, em um ciclo de compressão, com velocidade de pré-teste de 2 mm s⁻¹, teste de 1 mm s⁻¹ e pós-teste de 2 mm s⁻¹. Os índices de firmeza foram calculados a partir das curvas características do perfil de textura gerada no programa Texture Expert Stable Micro Systems, sendo os resultados expressos em Newton (N).

25.8. Análise de composição de cor

A cor foi medida usando colorímetro Color Quest H (Hunter lab, Reston, Virgínia, USA) com escala CIELab (L*, a* e b*). A partir das coordenadas L*, a* e b* foram calculados o valor de Hue (h) (Eq. (1)), Chroma (c*) (Eq. (2)), índice de cor (IC) (Eq. (3)), índice de brancura (IB) (Eq. (4)) e diferença total de cor (ΔE) (Eq. (5)) de acordo com as equações seguintes:

$$h = \arctang \frac{b^*}{a^*} \quad (1)$$

$$c^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

$$IC = (a^* \times 1000) / (L^* \times b^*) \quad (3)$$

$$IB = 100 - [(100 - L^*)^2 + ((a^*)^2 + ((b^*)^2)]^{1/2} \quad (4)$$

$$\Delta E = [(a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2 + (L^* - L^*_0)^2]^{1/2} \quad (5)$$

259. pH, acidez total titulável e sólidos solúveis totais

As fatias de cenoura dos cinco tratamentos foram trituradas em processador doméstico de alimentos. O pH das amostras foi determinado através de medidor de pH (mPA-210, Tecnopon, Brasil) imergindo o potenciômetro na amostra diluída em água (AOAC, 2000). Já a acidez total titulável foi determinada por diluição de aproximadamente 10 g de cada amostra em 100 mL de água destilada e adição de 3 gotas de indicador fenolftaleína. Em seguida, procedeu-se a titulação com uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol L⁻¹, com o acompanhamento de pHmetro, até o ponto de viragem da fenolftaleína (pH 8,3) (AOAC, 2000). A acidez total titulável foi calculada em relação % (m/m) de ácido cítrico. O teor de sólidos solúveis totais foi determinado diretamente em refratômetro de bancada modelo ABBÉ (Modelo WYA-2S, Marca Polax), a temperatura de 25 °C, sendo os resultados expressos em °Brix (AOAC, 2000).

2.6. Análise estatística

Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado em parcelas subdivididas, em que nas parcelas foram avaliados os tratamentos e nas subparcelas os tempos de armazenamento. Os dados obtidos foram interpretados por análise de variância (ANOVA) utilizando teste F, teste t e teste de Tukey para comparação de médias e análise de regressão ao nível de 5 % de probabilidade. Para isso foi utilizado o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da Qualidade Microbiológica

No presente estudo, constatou-se ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de cenoura minimamente processada adicionada de revestimento comestível durante todo o período de armazenamento do produto. Também verificou-se que no armazenamento ocorreu aumento da contagem de fungos filamentosos e leveduras e de bactérias psicrótróficas, entretanto, esse aumento não diferiu ($p > 0,05$) quando foi comparada a contagem inicial (logo após o processamento) com a contagem final (após 12 dias de armazenamento) dos produtos. Quando avaliada a qualidade do produto no tempo inicial e no tempo final, constatou-se que a adição dos revestimentos comestíveis não influenciou ($p > 0,05$) a contagem dos micro-organismos deterioradores (Tabela 2). Dessa forma, levando em

consideração a regulamentação francesa e extrapolando para outros micro-organismos deterioradores, todas as amostras avaliadas estavam de acordo com o recomendado durante os 12 dias de armazenamento refrigerado. Apenas para micro-organismos psicotróficos constatou-se contagem acima de 6,0 Log UFC g⁻¹ nos tratamentos *in natura* e controle após 12 dias a 4 °C de vida de prateleira.

Em muitos países, incluindo o Brasil, existe carência de uma legislação específica que defina os parâmetros microbiológicos de frutas e hortaliças minimamente processadas. Essa situação gera dificuldade para que os produtores e consumidores alcancem parâmetros de qualidade e segurança desses alimentos. No entanto, países da União Européia e EUA possuem especificações microbiológicas para vegetais cortados em que se isentam a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais e enterobacteriaceae justificando que sua elevada população é característica de ambientes naturais das plantas (RANJITHA et al., 2017). Já a regulamentação francesa determina para cenoura recém-cortada no máximo 7,7 Log UFC g⁻¹ de contaminação aceitável para contagem total em placas de bactérias mesofílicas (FAI et al., 2016).

Os resultados obtidos nesse estudo para a contagem de fungos filamentosos e leveduras e bactérias psicotróficas em fatias de cenoura revestidas armazenadas a 4°C corrobora com os encontrados por Fai et al. (2016) trabalhando com cenoura minimamente processada revestida com farinha de resíduos de frutas e vegetais e Lai; Chen; Lai (2013) investigando cenoura minimamente processada revestida com amido de mandioca.

Tabela 2 – Contagem padrão em placas inicial e final de fungos filamentosos e leveduras e de psicrotróficos em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos armazenados a 4 °C

Amostras	Fungos Filamentosos e Leveduras (Log UFC g ⁻¹)		Psicrotróficos (Log UFC g ⁻¹)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
CIN	2,22 ± 0,33 aA	4,74 ± 1,51 bA	4,08 ± 0,56 aA	6,43 ± 2,02 aA
CRC	1,88 ± 0,56 aA	4,65 ± 1,03 aA	3,79 ± 0,52 aA	6,35 ± 0,79 aA
CRLP	2,63 ± 0,78 aA	4,67 ± 2,23 aA	3,30 ± 0,56 aA	5,93 ± 1,63 aA
CRLPA	2,21 ± 0,15 aA	4,29 ± 0,57 aA	3,62 ± 0,34 aA	5,68 ± 0,54 aA
CRLPLPA	2,58 ± 0,89 aA	4,00 ± 1,99 aA	3,80 ± 0,27 aA	5,53 ± 1,99 aA

Inicial: dia zero; Final: após 12 dias.

a-b Letras minúsculas iguais entre as linhas indicam valores significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acordo com o teste t. Letras maiúsculas iguais nas colunas indicam valores significativamente iguais ($p > 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum* (CH6072 e L286), CRLPA: *L. paracasei* BGP1, CRLPLPA: *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1.

Ao longo do período de armazenamento verificou-se que todos os tratamentos apresentaram aumento da contagem de fungos filamentosos e leveduras e de bactérias psicrotróficas e que o tempo de armazenamento refrigerado apresentou influência significativa ($p < 0,05$) sobre o aumento da contagem desses micro-organismos (Figura 1).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a cenoura minimamente processada recoberta com revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação é um alimento seguro estando próprio para o consumo humano ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 °C.

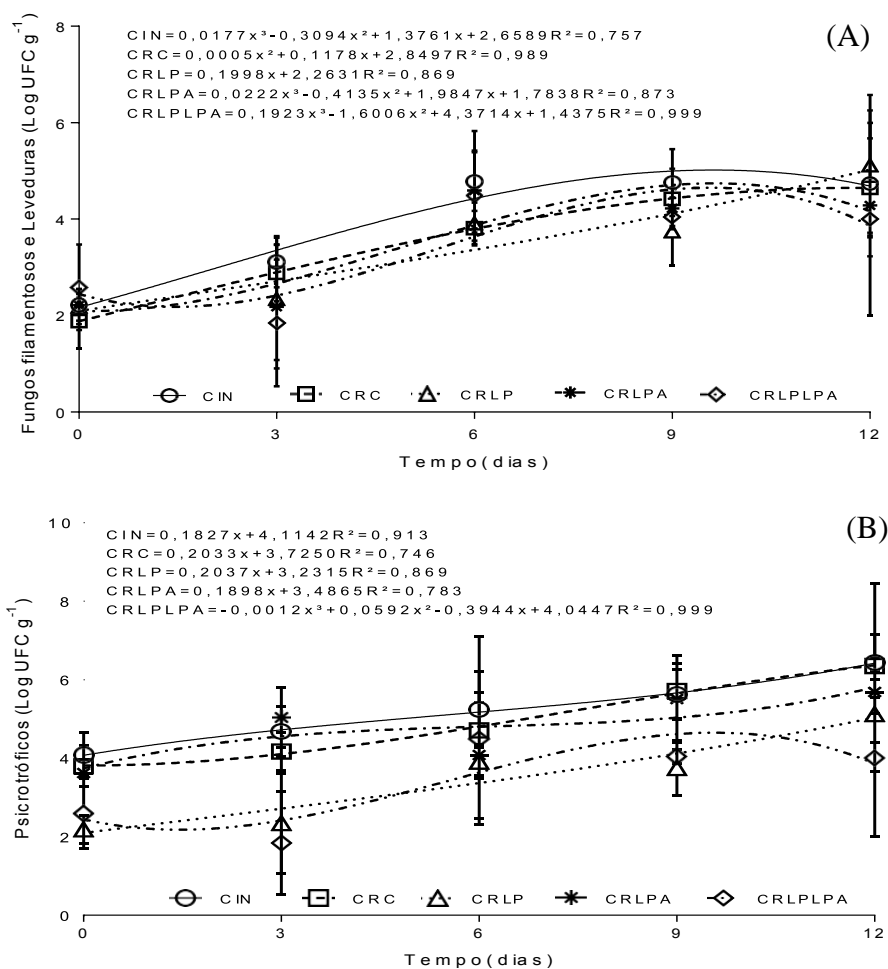


Figura 1 - Variação da contagem padrão em placas de fungos filamentosos e leveduras (A) e de bactérias psicotróficas (B) em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos ao longo do período de armazenamento refrigerado (4 °C). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

3.2. Viabilidade dos micro-organismos probióticos em cenoura minimamente processada adicionada de revestimento comestível

De acordo com Tripathi; Giri (2014), é necessário que os produtos probióticos contenham no mínimo 6,0 Log UFC g⁻¹ destes micro-organismos para que os benefícios da sua ingestão sejam obtidos pelos consumidores. As cenouras minimamente processadas apresentaram uma contagem média de, no mínimo, 6,2 Log UFC g⁻¹ para as amostras adicionadas de micro-organismos probióticos (Tabela 3) estando, portanto, de acordo com a concentração mínima de células viáveis recomendada. Em relação aos tratamentos que não foram adicionados de bactérias probióticas (CIN e CRC) não foi constatada contagem destes micro-organismos.

Tabela 3 - Contagem média de bactérias probióticas em cenoura minimamente processada dos diferentes tratamentos durante 12 dias de armazenamento a 4 °C

Tratamento	Contagem de Células Viáveis (Log UFC g ⁻¹)
CIN	0,0 ± 0,0 c
CRC	0,0 ± 0,0 c
CRLP	7,85 ± 1,63 a
CRLPA	6,20 ± 1,65 b
CRLPLPA	6,30 ± 2,27 b

a-c Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

Houve redução da viabilidade das culturas probióticas ao longo do período de armazenamento ($p < 0,05$) das cenouras minimamente processadas (Figura 2), sendo a menor contagem observada nas cenouras recobertas com o revestimento contendo misturas das culturas de *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1 (4,9 Log UFC g⁻¹). Entretanto, considerando o consumo de 100 g de cenoura minimamente processada, o consumidor irá adquirir 6,9 Log UFC g⁻¹, quantidade suficiente para obter os benefícios fornecidos pelas culturas probióticas.

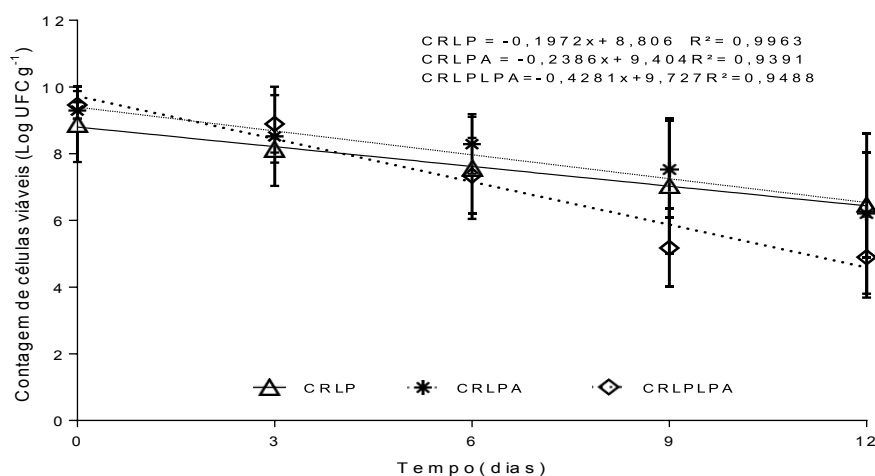


Figura 2 - Variação da contagem padrão em placas de cenoura minimamente processadas revestidas ao longo do período de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$). CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

3.3. Resistência ao trato gastrointestinal simulado *in vitro* de bactérias probióticas em cenoura minimamente processada

Para exercer benefícios os probióticos devem atingir o intestino em quantidade suficiente. Para que isso ocorra, os micro-organismos probióticos devem sobreviver ao suco gástrico, que possui pH baixo e proteases, e ao suco intestinal, que contém sais biliares, proteases, lipases e nucleases. Por isso, a capacidade que a bactéria possui de sobreviver ao armazenamento não é necessariamente a mesma capacidade que ela tem de superar as condições do trato gastrointestinal. Portanto, para definir a capacidade funcional de um alimento deve ser levado em consideração a resistência da bactéria probiótica ao suco gástrico e intestinal (TAVERA-QUIROZ et al., 2015).

No presente estudo, verificou-se que as cenouras minimamente processadas revestidas submetidas às condições gastrointestinais simuladas apresentaram redução ($p < 0,05$) da contagem das bactérias probióticas ao longo do período de armazenamento (Figura 3). Verificou-se também que o tratamento CRLPLPA não forneceu ao consumidor a quantidade mínima de bactérias probióticas para obter os seus benefícios, enquanto os tratamentos CRLP e CRLPA foram capazes de oferecer a quantidade suficiente das bactérias em estado viável até o 6º e 12º dia de armazenamento, respectivamente.

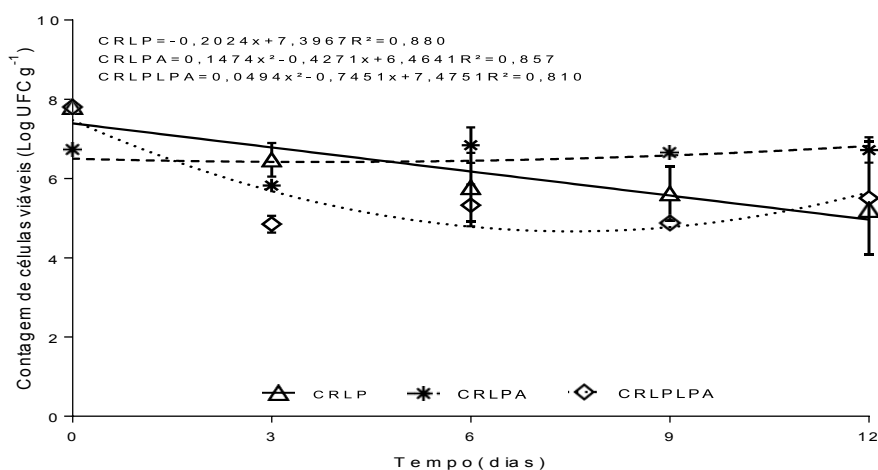


Figura 3 - Variação da contagem de células viáveis resistente às condições gastrointestinais simuladas em fatias de cenoura revestidas ao longo do período de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

Verificou-se também que logo após o processamento o tratamento CRLP foi o que apresentou a maior capacidade de sobrevivência (perda de 3,50%) às condições

gastrointestinais, seguido dos tratamentos CRLPLPA (redução de 17,35%) e CRLPA (perda de 27,54%) (Figura 4). Pode-se inferir que a redução de viabilidade do tratamento CRLPLPA foi menor do que a do CRLPA devido a maior resistência do micro-organismo *L. plantarum* às condições gastrointestinais.

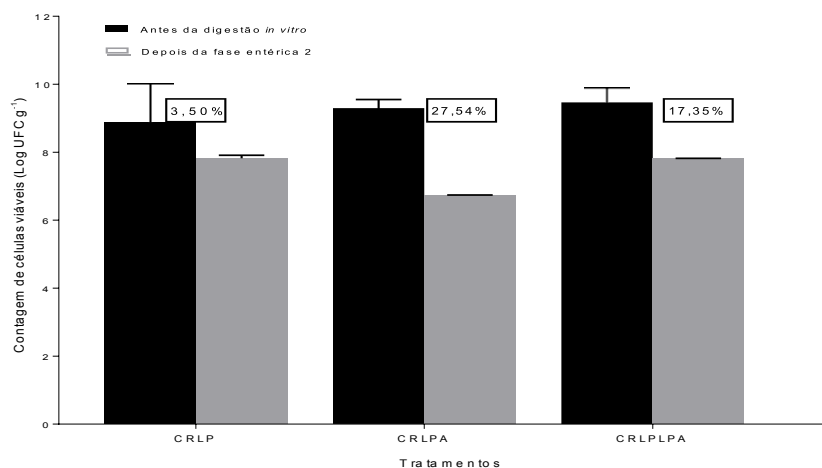


Figura 4 – Comparação da contagem de células viáveis de bactérias probióticas antes e após a digestão *in vitro* em fatias de cenoura logo após a aplicação do revestimento comestível. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

Por meio desses resultados, constata-se que cenoura minimamente processada contendo revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação foi capaz de carrear as culturas probióticas, sendo uma matriz promissora para veicular *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1.

3.4. Adesão dos revestimentos comestíveis em cenoura minimamente processada e distribuição das bactérias probióticas no tecido vegetal observadas por microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura das cenouras minimamente processadas revestidas permitiram a visualização das bactérias probióticas no revestimento comestível (Figura 5 – b, c e d) sem conferir qualquer modificação notável na adesão do revestimento à superfície da hortaliça. Em todos os casos os revestimentos, a base de pectina de baixa metoxilação, mantiveram sua estrutura coesa porém não uniforme sobre a superfície da cenoura, caracterizado por alguns pontos onde houve rompimento do revestimento devido a etapa de desidratação necessária para a realização da análise de MEV.

Verifica-se também que as células bacterianas foram incorporadas na matriz do revestimento (pequenas formas no tipo de hastes, como indicado pelas setas) sem alteração de sua morfologia encontrando-se bem distribuídas por todo o tecido vegetal e com a capacidade de permanecer embutidas no revestimento comestível ao longo do período de armazenamento das cenouras minimamente processadas revestidas. Essas imagens demonstram que o revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação é uma matriz promissora para a incorporação e veiculação de *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura de *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1.

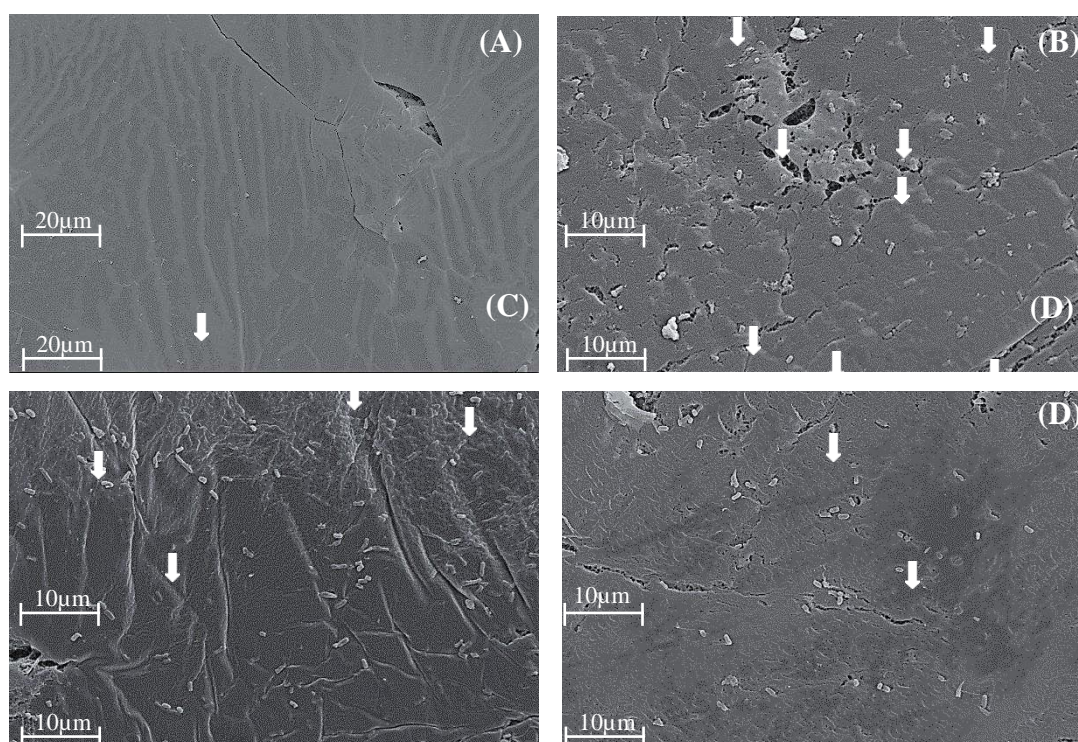


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de cenoura minimamente processada recobertas com revestimento de pectina de baixa metoxilação contendo microorganismos probióticos ou não. (A) revestimento sem adição de bactéria probiótica, (B) revestimento com adição de *L. plantarum* (CH6072 e L286), (C) revestimento com adição de *L. paracasei* BGP1, (D) revestimento mistura com adição de *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1. As barras de escala são indicadas nas imagens com aumento de 781x (a), 4120x (b), 4000x (c), 4000x (d).

3.5. Atividade antimicrobiana das bactérias probióticas em cenoura minimamente processada

Verificou-se que os revestimentos comestíveis de pectina adicionados das estirpes probióticas de *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura dessas

bactérias não apresentaram ($p>0,05$) efeito antagonista frente as bactérias *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 (Tabela 3). Como os revestimentos probióticos testados apresentaram antagonismo contra essas bactérias em teste *in vitro* (resultados não apresentados) acredita-se ser necessário um período de adaptação dos microorganismos probióticos no revestimento antes de sua aplicação nos vegetais para que os compostos antimicrobianos sejam produzidos e apresentem atividade antimicrobiana.

Tabela 4 – Contagem padrão em placas média (Log UFC g⁻¹) de *E. coli* e *L. innocua* em cenouras minimamente processadas revestidas armazenadas a 4 °C

Tratamentos	<i>E. coli</i> (Log UFC g ⁻¹)	<i>L. innocua</i> (Log UFC g ⁻¹)
CRC	6,37 ± 0,92 a	6,01 ± 0,55 a
CRLP	6,45 ± 0,96 a	6,15 ± 0,68 a
CRLPA	6,69 ± 0,70 a	6,10 ± 0,70 a
CRLPLPA	6,37 ± 0,86 a	6,33 ± 0,77 a

a Letras iguais nas colunas indicam valores significativamente iguais ($p>0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

3.6. Perda de massa

A perda de massa das fatias de cenoura durante o armazenamento (Figura 6) ocorreu de maneira gradual ($p<0,05$) em todos os tratamentos avaliados. A perda de massa das cenouras minimamente processadas revestidas durante o armazenamento refrigerado é correspondente a perda de água que ocorre devido à transpiração com consequente desidratação vegetal. Constatou-se também que as amostras avaliadas não apresentaram uma elevada taxa de perda de massa, tendo uma perda máxima de 4 % e que o revestimento produzido neste estudo não atuou como barreira à migração de umidade das amostras para o ambiente uma vez que, as cenouras revestidas não diferiram ($p>0,05$) daquelas *in natura* (CIN).

Resultados semelhantes foram encontrados por Wang et al. (2015) que constataram uma perda máxima de massa de 2 % e 1 % para fatias de cenoura não revestidas e revestidas, respectivamente, com filmes comestíveis de purê de cenoura. Já Fai et al. (2016) constataram uma maior perda de massa, em torno de 21-35%, em fatias de cenoura revestidas com filmes obtidos a partir de sub-produtos do processamento de frutas e hortaliças.

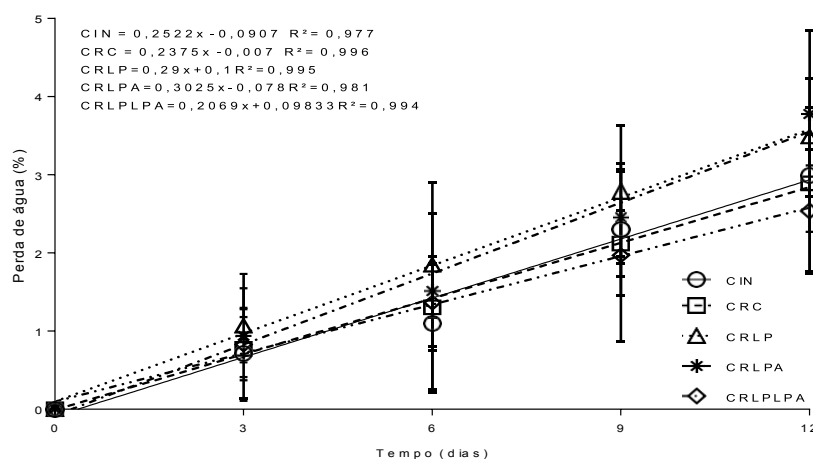


Figura 6 – Perda de massa (%) das cenouras minimamente processadas, revestidas ou não, ao longo de 12 dias a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

3.7. Firmeza

A adição do revestimento comestível as cenouras fatiadas não conferiu ($p > 0,05$) maior firmeza em relação ao tratamento CIN. Entretanto, quando foi comparada a firmeza inicial com a firmeza final das amostras constatou-se que apenas a amostra CIN apresentou diferença ($p \leq 0,05$) entre os tempos (Tabela 5). Dessa forma, o revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação foi eficiente para a manutenção da firmeza de cenouras minimamente processadas durante o armazenamento a 4 °C.

Tabela 5 – Firmeza das fatias de cenoura, revestidas ou não, durante 12 dias de armazenamento a 4 °C

Tratamentos	Firmeza (N)	
	Inicial	Final
CIN	7,59 \pm 0,82 aA	10,22 \pm 1,74 bA
CRC	8,85 \pm 2,36 aA	9,29 \pm 0,64 aA
CRLP	9,72 \pm 1,65 aA	10,07 \pm 0,97 aA
CRLPA	9,11 \pm 1,43 aA	9,74 \pm 0,39 aA
CRLPLPA	9,09 \pm 0,81 aA	10,07 \pm 0,14 aA

a-b Letras minúsculas diferentes entre as linhas indicam valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste t. Letras maiúsculas iguais nas colunas indicam valores significativamente iguais ($p > 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

3.8. Avaliação dos parâmetros e índice de cor de cenoura minimamente processada

Os parâmetros (L^* , a^* e b^*) e os índices de qualidade de cor (C^* , Hue, IC, IB e ΔE) dos diferentes tratamentos de cenoura minimamente processada foram avaliados durante 12 dias de armazenamento refrigerado e constatou-se que o período de armazenamento a 4 °C e a aplicação dos diferentes revestimentos comestíveis não apresentaram influência significativa ($p>0,05$) sobre os parâmetros e os índices avaliados (Tabela 6).

De acordo com os parâmetros L^* , a^* e b^* constatou que todas as amostras analisadas tenderam a maior luminosidade na escala de cinza, a coordenada a^* ao vermelho e a coordenada b^* ao amarelo. Quando avaliado o ângulo Hue, verificou-se que as amostras apresentaram-se na cor laranja e o Chroma indicou que a saturação das amostras tendem a uma cor vivida. Dessa forma, destaca-se que todas as amostras permaneceram durante todo o armazenamento com uma coloração laranja intensa e que a adição dos revestimentos probióticos não interferiram nessa característica natural das cenouras.

Quando avaliado o índice de cor observou-se a cor laranja nas amostras uma vez que, IC com valores positivos entre 2 e 20 estão associados a cores amarelo pálido e laranja escuro e entre 20 e 40 as cores profundas de laranja e vermelho escuro (GOYENECHE et al., 2014).

Maiores valores de IB indicam o maior desenvolvimento do branqueamento superficial. Portanto verifica-se que a adição dos revestimentos na superfície das fatias de cenoura não alterou ($p>0,05$) as características das amostras (Tabela 6) mas o tempo de armazenamento ocasionou ($p\leq 0,05$) um aumento deste parâmetro (Figura 7). Resultados similares de aumento do índice de brancura ao longo do período de armazenamento de cenouras fatiadas revestidas ou não foram encontrados por Fai et al. (2016), Wang et al. (2015) e Lai; Chen; Lai (2013).

Tabela 6 – Valores médios dos parâmetros (L*, a*, b*) e índices de qualidade (hue, chroma, índice de cor – IC, índice de brancura – IB e diferença total de cor - ΔE) da cor das fatias de cenoura ao longo do período de armazenamento a 4 °C

Amostra	L*	a*	b*	Hue	Chroma	IC	IB	ΔE
CIN	63,64 ± 0,84 a	22,56 ± 1,56 a	27,59 ± 1,12 a	68,00 ± 0,02 a	35,64 ± 1,79 a	12,84 ± 0,57 a	49,07 ± 1,61 a	2,74 ± 1,46 a
CRC	62,29 ± 1,78 a	23,63 ± 2,07 a	29,25 ± 2,04 a	68,00 ± 0,02 a	37,61 ± 2,80 a	12,98 ± 0,77 a	46,70 ± 2,58 a	4,27 ± 2,89 a
CRLP	61,22 ± 1,01 a	23,66 ± 1,23 a	28,84 ± 1,55 a	69,00 ± 0,01 a	37,30 ± 1,91 a	13,41 ± 0,55 a	46,18 ± 1,65 a	2,25 ± 1,79 a
CRLPA	61,71 ± 1,61 a	23,09 ± 2,32 a	28,59 ± 1,85 a	68,00 ± 0,03 a	36,76 ± 2,81 a	13,09 ± 0,95 a	46,90 ± 2,72 a	3,10 ± 1,92 a
CRLPLPA	61,46 ± 1,03 a	21,43 ± 3,16 a	27,27 ± 2,51a	66,00 ± 0,01 a	34,80 ± 2,64 a	12,95 ± 2,75 a	48,05 ± 2,42 a	4,79 ± 3,82 a

Letras iguais nas colunas indicam valores significativamente iguais (p>0,05) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

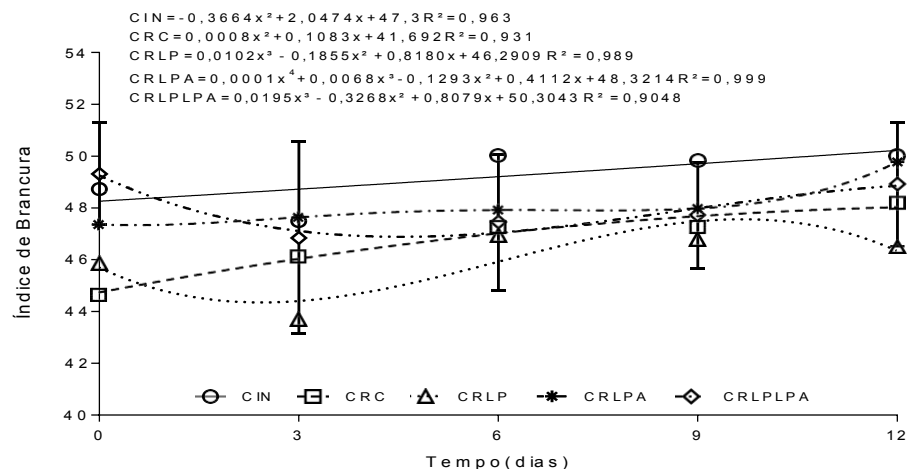


Figura 7 – Índice de Brancura das cenouras dos diferentes tratamentos durante a vida de prateleira sob refrigeração. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*.

Segundo Fai et al. (2016), a perda de água na cenoura minimamente processada está diretamente relacionada com a descoloração da superfície desta hortaliça e neste estudo corrobamos esta afirmação através da verificação do aumento do índice de brancura e da reduzida perda de água durante a vida de prateleira das amostras. A não alteração dos parâmetros de cor e dos outros índices de qualidade da cor estão diretamente relacionados com a pequena perda de água das amostras.

De acordo com Goyeneche et al. (2014), a diferença total de cor é aplicada para medir a diferença entre duas cores de acordo com o intervalo a seguir: 0,0 a 0,5 - diferença de nível de traço, 0,5 a 1,5 - pequena diferença, 1,5 a 3,0 - diferença notável, 3,0 a 6,0 - diferença apreciável, 6,0 a 12,0 - grande diferença e maior que 12 uma diferença muito óbvia. Observou-se no presente estudo uma variação não significativa ($p>0,05$) nos valores de ΔE para todos os tratamentos analisados englobando, assim, as amostras em dois grupos: amostras que apresentaram diferença notável (CIN e CRLP) e amostras que apresentaram diferença apreciável (CRC, CRLPA e CRLPLPA).

Portanto, a adição do revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação adicionado de bactérias probióticas não alterou as características de cenoura fatiada remetendo ao consumidor um produto similar ao *in natura*.

3.9. Análises químicas de cenoura minimamente processada

O período de armazenamento a 4 °C não influenciou ($p>0,05$) a acidez total titulável, o pH e o teor de sólidos solúveis totais, dos diferentes tratamentos de cenoura minimamente processada (Tabela 7). Também, não foi constatada diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos para acidez total titulável, pH e teor de sólidos solúveis totais (Tabela 7), podendo-se afirmar que a adição do revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação contendo ou não bactéria probiótica não alterou essas características químicas do produto.

Tabela 7 – Comparação das médias de acidez total titulável (ATT), pH e sólidos solúveis totais (SST) do dia inicial e final de armazenamento

Tratamentos	ATT		pH		SST	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
CIN	1,18 ± 0,21 aA	0,90 ± 0,15 bA	7,22 ± 1,68 aA	6,43 ± 0,52 aA	8,25 ± 0,66 aA	7,98 ± 0,42 bA
CRC	1,06 ± 0,36 aA	0,84 ± 0,15 aA	6,28 ± 0,08 aA	6,30 ± 0,45 aA	7,78 ± 0,94 aA	7,48 ± 0,60 aA
CRLP	1,08 ± 0,14 aA	0,71 ± 0,19 aA	6,24 ± 0,19 aA	6,16 ± 0,07 aA	7,50 ± 1,13 aA	7,05 ± 0,65 aA
CRLPA	1,14 ± 0,6 aA	0,76 ± 0,32 aA	6,33 ± 0,81 aA	6,18 ± 0,30 aA	7,52 ± 0,73 aA	6,80 ± 0,30 aA
CRLPLPA	1,33 ± 0,42 aA	0,95 ± 0,64 aA	6,41 ± 0,39 aA	5,90 ± 0,35 aA	7,68 ± 0,99 aA	7,17 ± 0,53 aA

Inicial: dia zero; Final: após 12 dias.

a-b Letras minúsculas iguais entre as linhas indicam valores significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acordo com o teste t. Letras maiúsculas iguais nas colunas indicam valores significativamente iguais ($p > 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). CIN: *in natura*, CRC: controle, CRLP: *L. plantarum*, CRLPA: *L. paracasei*, CRLPLPA: *L. plantarum* e *L. paracasei*

4. CONCLUSÃO

As condições definidas neste estudo demonstraram que a adição dos revestimentos comestíveis contendo as culturas probióticas de *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura dessas bactérias probióticas em cenoura minimamente processada apresentaram resistência em relação às condições de processamento, armazenamento e gastrointestinas simuladas fornecendo cerca de 5,21 Log UFC g⁻¹, 6,72 Log UFC g⁻¹ e 5,51 Log UFC g⁻¹ dessas bactérias probióticas, respectivamente, em até 12 dias de processamento. Esses valores asseguram que a ingestão de cerca de 100 g de cenoura minimamente processada adicionada de revestimento comestível contendo *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 ou a mistura dessas culturas é a quantidade necessária para que o produto seja considerado probiótico.

A adição de revestimentos comestíveis a base de pectina de baixa metoxilação contendo culturas probióticas em cenoura minimamente processada não apresentou atividade antimicrobiana frente à *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 e não alterou as características físicas e químicas do produto.

O revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação pode atuar como uma matriz promissora para incorporar bactérias probióticas nos alimentos e a cenoura minimamente processada recoberta com revestimento comestível probiótico é uma alternativa de alimento funcional de base não láctea para o consumidor.

5. REFERÊNCIAS

ALDANA, D. S.; ANDRADE-OCHO, S.; AGUILAR, C. N.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; NEVÁREZ-MOORILLÓN B, G. V. Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. **Food Control**, v. 50, p. 907-912, 2015.

ANDREWS, W.H.; FLOWER, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. Salmonella. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 357-380, 2001.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 16. ed. Washington, DC, 2000.

BERISTAIN-BAUZA, S. C.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BETORET, E.; BETORET, N.; ARILLA, A.; BENNÁR, M.; BARRERA, C.; CODOÑER, P.; FITO, P. No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 289–293, 2012.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association – APHA, p. 159-166, 2001.

DOWES, F. P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association - APHA, DC., 2001. 676 p.

FAI, A. E. C.; SOUZA, M. R. A.; BARROS, S. T.; BRUNO, N. V.; FERREIRA, M. S. L.; GONÇALVES, É. C. B. A. Development and evaluation of biodegradable films and coatings obtained from fruit and vegetable residues applied to fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 194–204, 2016.

FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Report, 2002.

GOYENECHÉ, R., AGÜERO, M. V., ROURA, S., SCALA, K. D. Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: color valuation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 93, p. 106–113, 2014.

LAI, T.Y., CHEN, C.H., LAI, L.S. Effects of tapioca starch/decolorized hsian-tsoo leaf gum based active coatings on the quality of minimally processed carrots. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 249–258, 2013.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1–16, 2007.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. DE O.; MARTINS, J. M. Products of Vegetable Origin: A New Alternative for the Consumption of Probiotic Bacteria. **Food Research International**. v. 51, p. 764–770, 2013.

MOREIRA, M. R.; ROURA, S. I.; PONCE, A. Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 2335–2341, 2011.

RANJITHA, K.; SHIVASHANKARA, K. S.; RAO, D. V. S.; OBEROI, H. S.; ROY, T.K.; BHARATHAMMA, H. Improvement in shelf life of minimally processed cilantro leaves through integration of kinetin pretreatment and packaging interventions: Studies on microbial population dynamics, biochemical characteristics and flavour retention. **Food Chemistry**, v. 221, p. 844–854, 2017.

RICHER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed., Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 483–496, 2001.

SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; GAN, H.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; PARMENTER, C.; FISK, I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 231–242, 2014.

TAVERA-QUIROZ, M. J.; ROMANO, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; BERTOLA, N. Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 164–173, 2015.

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.

VICENTINI, A.; LIBERATORE, L.; MASTROCOLA, D. Functional foods: Trends and development of the global market. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, p. 338–351, 2016.

WANG, X.; KONG, D.; MA, Z.; ZHAO, R. Effect of carrot puree edible films on quality preservation of fresh-cut carrots. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 54, p. 64–71, 2015.

CAPÍTULO 3

Revestimento comestível suplementado de culturas probióticas e adição em goiaba minimamente processada

RESUMO

O objetivo deste estudo foi adicionar revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação contendo micro-organismos probióticos em goiaba minimamente processada. As goiabas minimamente processadas recobertas com revestimento comestível controle e contendo *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286), *Lactobacillus paracasei* BGP1 e a combinação *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1 foram armazenadas a 4 °C e avaliadas quanto a qualidade microbiológica (fungos filamentosos e leveduras, bactérias psicotróficas e *Salmonella* sp.), viabilidade das bactérias probióticas, sobrevivência das culturas probióticas ao trato gastrointestinal simulado *in vitro*, microscopia eletrônica de varredura, atividade antimicrobiana frente à *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 e as características físicas (perda de massa, firmeza e cor) e químicas (acidez total titulável, pH, sólidos solúveis totais) durante 10 dias. A viabilidade das culturas probióticas na goiaba minimamente processada revestida se manteve (média de 7,58 Log UFC g⁻¹) até o décimo dia de vida de prateleira. A adição das culturas probióticas aos revestimentos também não alterou (p>0,05) a contagem de micro-organismos deterioradores e *Salmonella* sp. nas fatias de goiaba. A simulação *in vitro* das condições gastrointestinais reduziu a contagem de células viáveis, no decorrer da vida de prateleira, de todos os tratamentos apresentando maior redução, em torno de 1,8 Log UFC g⁻¹, sobre *L. plantarum* (CH6072 e L286). Comparando a viabilidade antes e após a digestão *in vitro* verificou que *L. plantarum* (CH6072 e L286) foi o que sofreu a menor redução da viabilidade (13,20%) sendo o mais resistente. A adição de micro-organismos probióticos ao revestimento comestível a base de pectina não alterou (p>0,05) as características físicas e químicas da fruta dos diferentes tratamentos. O período de armazenamento influenciou (p<0,05) a acidez total titulável, teor de sólidos solúveis totais, perda de massa, firmeza e luminosidade (L*) de todos os tratamentos avaliados. A goiaba minimamente processada recoberta com revestimentos comestíveis adicionados de

culturas probióticas representam uma alternativa de produto não lácteo probiótico. O revestimento a base de pectina de baixa metoxilação foi capaz de carrear culturas probióticas constituindo numa nova forma de veiculação dessas bactérias para o consumidor.

Palavras-Chave: fresh cut guava, pectina de baixa metoxilação, digestão gastrointestinal *in vitro*, lactobacilos, microscopia.

1. INTRODUÇÃO

Goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta climatérica, rica em vitamina C, carotenoides, potássio, fibras, cálcio e ferro, além de possuir pró-vitamina A, vitaminas do complexo B, baixo conteúdo calórico e ótimo potencial antioxidante, sendo considerada uma excelente fruta para o consumo humano. Apesar de seu valor nutritivo, o comércio mundial de goiaba é limitado devido à sua reduzida vida de prateleira (GILLA et al., 2016), uma vez que o estágio de maturação da fruta afeta suas propriedades físicas e químicas. Assim, para prolongar o período de armazenamento de frutas na pós-colheita a adição de revestimento comestível é um método promissor que atua no controle da perda de umidade e aroma, inibe a penetração de oxigênio no tecido da planta e o crescimento microbiano (CHANDRAHASA; LAXMIA, 2016).

O revestimento comestível é definido como camadas finas de materiais poliméricos que são aplicados, como um líquido de viscosidade variada, na superfície de alimentos por meio de imersão, pulverização ou escovagem. Muitos tipos de materiais poliméricos com diferentes funções têm sido utilizados no desenvolvimento de revestimentos comestíveis, tais como polissacarídeos, proteínas e lipídios (KHARE et al., 2016).

Pectina, um polissacarídeo naturalmente encontrado na parede celular de vegetais, é capaz de formar géis fortes e em função do seu caráter hidrofílico apresenta a capacidade de envolver grande quantidade de água. Várias publicações têm documentado a efetividade dos revestimentos comestíveis de pectina para prolongar a vida de prateleira de algumas frutas como maçã, pêra e melão (BAYARRI, et al., 2014; MOREIRA et al., 2016). O principal tipo de pectina utilizada na formulação de revestimento comestível é a de baixo grau de metoxilação devido a sua capacidade de formar géis firmes a pH baixo e na presença de íons cálcio (Ca^{+2}), promovendo maior firmeza e integridade estrutural além de, reduzir a permeabilidade ao vapor de água (VALDÉS et al., 2015).

Os revestimentos comestíveis vem sendo estudados como bons transportadores de compostos ativos tais como, vitaminas, antioxidantes e culturas probióticas (SOUKOULIS et al., 2014). Probióticos são micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas ($6,0 - 9,0 \text{ Log UFC g}^{-1}$ ou mL^{-1}) conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; LÓPEZ DE LACEY et al., 2012). O uso de probióticos têm sido elevado com o principal objetivo de reforçar a microbiota intestinal benéfica e inibir o desenvolvimento de bactérias nocivas (MITSUOKA, 2014). Cada vez mais tem sido utilizada a adição de probióticos em alimentos, embora verificasse a necessidade destes micro-organismos serem mantidos vivos. A presença das culturas probióticas nos alimentos depende da sua formulação e técnica de produção dos alimentos de modo a fornecer mecanismos de proteção que mantêm as células viáveis e ativas até o momento do consumo (DA SILVA et al., 2016).

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia da entrega e manutenção de bactérias probióticas em goiaba minimamente processada por meio do uso de revestimentos comestíveis a base de pectina de baixa metoxilação bem como a conservação deste produto durante o armazenamento refrigerado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estirpes bacterianas probióticas

Estirpes probióticas comerciais de *Lactobacillus paracasei* BGP1 foi adquirida da SACCO Brasil (Brasil) e *Lactobacillus plantarum* (CH6072 e L286) da Christian Hansen (Dinamarca).

2.2. Preparo das células probióticas

As estirpes probióticas liofilizadas foram pré-ativadas, segundo Beristain-Bauza et al. (2016) com modificações, inoculando-se separadamente uma alçada de cada cultura em 50 mL de caldo Man Rogosa Sharpe – MRS (Acumedia, Brasil) sendo posteriormente incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas. Em seguida, as culturas pré-ativadas foram individualmente transferidas assepticamente para 350 mL de caldo MRS e mantidas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi centrifugado a 7000 g por 10 minutos e o *pellet* de células foi ressuscitado em água destilada estéril, obtendo uma concentração de $10,0 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ de bactéria probiótica (determinada previamente) para inoculação no revestimento comestível.

2.3. Preparo de revestimento comestível adicionado de bactérias probióticas

Dispersões de pectina de baixa metoxilação LM-102 AS (CPKelco, Brasil) foram preparadas por dissolução de 3 % (w/v) de pectina em água destilada a 70 °C. O revestimento comestível foi obtido por mistura da dispersão de pectina, à temperatura ambiente, com 3 % (v/v) de Tween 40 (Sigma Aldrich, EUA) e 2 % (v/v) de glicerol (Vetec, Brasil) em agitador magnético (AGI 103, Nova Ética, Brasil), até completa dissolução. Em seguida, os revestimentos foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A cada 100 mL de revestimento foram adicionados, diretamente, 1 mL de suspensão de células probióticas de modo a se obter 8,0 Log UFC mL⁻¹ no revestimento. Amostra controle foi preparada de acordo com o procedimento acima mencionado adicionando o mesmo volume de água destilada estéril sem a incorporação de célula probiótica. Para a obtenção das misturas foi adicionado uma concentração de 4,0 Log UFC mL⁻¹ de cada cultura probiótica.

Foram obtidos os revestimentos comestíveis de pectina do tratamento controle e contendo micro-organismos probióticos, *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1.

2.4. Seleção e processamento mínimo de goiaba

Goiabas (variedade 'Paluma') foram adquiridas no comércio local de Viçosa, Brasil, no estágio de maturação 2, que corresponde à fase de início de mudança de cor da casca de verde-escura para verde-clara. As goiabas foram lavadas em água corrente a 5 °C e, em seguida, mergulhadas em solução clorada (Sumaveg[®]) a 200 mg L⁻¹ durante 20 minutos, sendo então enxaguadas com solução clorada (Sumaveg[®]) a 20 mg L⁻¹ por 5 min. Posteriormente, as goiabas foram fatiadas em rodela de, aproximadamente, 1 cm e foram divididas aleatoriamente em quatro lotes de 600 g para cada revestimento.

2.5. Aplicação dos revestimentos comestíveis em goiaba minimamente processada

As goiabas minimamente processadas foram mergulhadas durante 3 minutos nos revestimentos controle, contendo micro-organismos probióticos *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1, e a mistura de *L. plantarum* (CH6072 e L286) com *L. paracasei* BGP1 e drenadas por 1 minuto. Em seguida, as goiabas minimamente processadas recobertas foram submergidas durante 1 minuto em solução de cloreto de

cálcio 1 % para a formação do gel de pectina. As goiabas minimamente processadas revestidas (Tabela 1) foram secas em secador de bandejas (PD-150, Poldryer, Brasil) com circulação de ar de 1 m s⁻¹ a uma temperatura de 35 °C. Após a secagem as goiabas minimamente processadas revestidas foram acondicionadas em bandejas de polipropileno e armazenadas a 4 °C durante 10 dias.

Tabela 1 – Goiabas minimamente processadas adicionadas de revestimento comestível

Tratamentos	Revestimentos
GRC	Controle - Sem probiótico
GRLP	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CH6072 e L286)
GRLPA	<i>Lactobacillus paracasei</i> BGP1
GRLPLPA	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CH6072 e L286) e <i>Lactobacillus paracasei</i> BGP1

2.6. Caracterização do produto

As análises microbiológicas, físicas e químicas foram realizadas em duplicata nos dias de armazenamento 0, 2, 4, 6, 8 e 10.

2.6.1. Viabilidade de micro-organismos probióticos em goiaba minimamente processada

A contagem padrão em placas das estirpes incorporadas nos revestimentos comestíveis aplicados na goiaba minimamente processada foi determinada através da diluição de 25 gramas de cada tratamento em 225 mL de solução salina peptonada (0,85 % NaCl e 0,1 % peptona). Foram realizadas diluições seriadas e 1 mL de cada diluição foi plaqueada pelo método *pour-plate* em ágar Man Rogosa Sharpe - MRS (Kasvi, Brasil). Após a solidificação adicionou-se uma sobrecamada de ágar MRS, e em seguida, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C durante 72 h (RICHER; VEDAMUTHU, 2001). Após o período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para determinar a população de bactérias probióticas na goiaba minimamente processada.

2.6.2. Sobrevivência das bactérias probióticas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foi avaliada segundo Liserre et al. (2007) e Buriti; Castro; Saad (2010) com modificações. Vinte e

cinco gramas de cada tratamento foram diluídos em 225 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 % e, em seguida, simulou-se as condições gastrointestinais. Retirou-se 10 mL da diluição anterior e adicionou-se 3,0 g L⁻¹ de pepsina (pepsina da mucosa do estômago de suíno, Sigma-Aldrich) e 0,9 mg L⁻¹ de lipase (amino lipase de *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich), e ajustou-se o pH para 2,3 - 2,6 com HCl 1N e incubou-se a 37 °C sob agitação de 150 rpm em banho-maria (Gyratory Water Bath Shaker G76D, New Brunswick Scientific CO, Inc. N. J., USA) durante 2 horas (fase gástrica). Na etapa seguinte, ajustou-se o pH para 5,4 - 5,7, com solução de fosfato de sódio pH 12 contendo bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina de pâncreas de suíno, Sigma-Aldrich) na proporção de 5,0 g L⁻¹ e 1,6 g L⁻¹, respectivamente. Reincubou-se as amostras a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 1). Em seguida, ajustou-se o pH para 6,8 - 7,2 utilizando solução de fosfato de sódio pH 12 contendo pancreatina (0,79 g L⁻¹) e bile (7,95 g L⁻¹). Reincubou-se novamente as amostras a 37 °C por 2 horas sob agitação de 150 rpm (fase entérica 2), totalizando 6 h de ensaio.

Ao término de cada fase do ensaio, alíquotas de 1 mL foram retiradas e submetidas às diluições seriadas com solução salina peptonada e plaqueadas pelo método *pour-plate* em ágar MRS. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C por 72 horas e posteriormente realizou-se a contagem das colônias (RICHER; VEDAMUTHU, 2001).

263. Avaliação da adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos adicionados nos revestimentos comestíveis aplicados sobre as fatias de goiaba

As goiabas minimamente processadas revestidas foram fatiadas em secções de 0,5 cm x 0,5 cm com, aproximadamente, 1 mm a 2 mm de espessura. Para realização da análise, a parte externa das fatias ficaram voltadas em direção ao feixe de elétrons de maneira que o revestimento comestível ficasse em contato com o feixe de elétrons. Para a desidratação das amostras foram realizados tratamentos seriados em acetona, nas graduações de 30 °GL, 50 °GL, 70 °GL por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 minutos, em acetona 80 °GL, 90 °GL e 100 °GL. Os cortes das fatias de goiaba foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer – modelo CPD020, Balzers, Liechstenstein) para a desidratação total e, então metalizados com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechstenstein) para posterior

observação ao microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP Zeiss, Cambridge, Inglaterra) e registro das imagens.

*Nota: Não foi possível realizar a etapa de fixação das células nas amostras uma vez que, o revestimento comestível tem afinidade pela solução de glutaraldeído 50 % e se desprendeu dos vegetais minimamente processados.

264. Avaliação da qualidade microbiológica de goiaba minimamente processada

Contagens de bactérias psicrotróficas, *Salmonella* sp. e de fungos filamentosos e leveduras em goiaba minimamente processada dos diferentes tratamentos foram determinadas ao longo do armazenamento refrigerado.

Para a determinação de bactérias psicrotróficas e fungos filamentosos e leveduras porções de 25 gramas de cada amostra (GRC, GRLP, GRLPA, GRLPLPA) em condições assépticas foram colocadas em saco plástico estéril. Em seguida, 225 mL de solução salina peptona (0,1 g de peptona + 0,85 g de NaCl em água destilada) foram adicionadas e homogeneizadas durante 1 minuto em Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience, França). Diluições seriadas foram realizadas e 1 mL de cada diluição foi inoculado pelo método *pour plate* em ágar padrão para contagem (PCA) previamente preparado e as placas foram incubadas a 7 °C durante 10 dias para determinação de bactérias psicrotróficas (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001) e, 0,1 mL de cada diluição foi espalhado sobre ágar batata dextrose (BDA) previamente preparado e incubados a 25 °C durante 7 dias para avaliação de fungos filamentosos e leveduras (DOWES; ITO, 2001).

Para determinação de presença/ausência de *Salmonella* sp., 25 g das amostras de goiaba minimamente processada foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada 1 % (Acumedia, Brasil) seguindo metodologia de Andrews et al. (2001). Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em Log UFC g⁻¹.

265. Avaliação da atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis em goiaba minimamente processada frente à *Escherichia coli* e *Listeria innocua*

O preparo do inóculo ocorreu através da ativação por duas vezes consecutivas das culturas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), onde uma alçada de cada cultura foi diluída em 50 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C por 16 horas. Em seguida, essas culturas pré-ativadas foram transferidas assepticamente para 350 mL de caldo BHI e

mantidas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, o caldo foi centrifugado a 7000 g por 10 minutos e o *pellet* de células obtido ressuspensionado em água destilada estéril de forma a se obter 8,0 Log UFC g⁻¹.

As fatias de goiaba foram imersas, separadamente, por 10 minutos nas soluções contendo *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090. Em seguida, as fatias de goiaba adicionadas destas bactérias indicadoras foram recobertas com os revestimentos comestíveis. A capacidade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis foi avaliada ao longo do armazenamento das goiabas minimamente processadas através da contagem padrão em placas de *E. coli* em ágar Macconkey a 37°C por 48 horas e *L. innocua* em ágar Palcam a 37°C por 48 horas.

266. Determinação do potencial hidrogeniônico, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis totais

A goiaba minimamente processada revestida dos quatro tratamentos foi triturada em processador doméstico de alimentos. O pH das amostras foi determinado através de medidor de pH (mPA-210, Tecnoyon, Brasil) imergindo o potenciômetro na amostra previamente diluída (AOAC, 2000). Já a acidez total titulável foi determinada por diluição de aproximadamente 10 g de cada amostra em 100 mL de água destilada e adição de 3 gotas de indicador fenolftaleína. Em seguida, procedeu-se a titulação com uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol L⁻¹ com o acompanhamento de pHmetro até o ponto de viragem da fenolftaleína (pH 8,3) (AOAC, 2000). A acidez total titulável foi calculada em relação % (m/m) de ácido cítrico. O teor de sólidos solúveis totais foi determinado diretamente em refratômetro de bancada modelo ABBÉ (Modelo WYA-2S, Marca Polax), a temperatura de 25 °C, sendo os resultados expressos em °Brix (AOAC, 2000).

267. Determinação da cor

A cor foi medida usando colorímetro Color Quest H (Hunter lab, Reston, Virgínia, USA) com escala CIELab (L*, a* e b*). Também foi avaliado o índice de escurecimento (IE), a intensidade de cor ou Chroma (c*) e o ângulo hue (h°) através das seguintes equações:

$$IE = \frac{[100 \cdot (x - 0,31)]}{0,172} \quad \text{em que,} \quad x = \frac{a^* + 1,75 \cdot L^*}{(5,645 \cdot L^*) + a^* - (3,02 \cdot b^*)} \quad (1)$$

$$c^* = \sqrt{[(a^*)^2 + (b^*)^2]} \quad (2)$$

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

268. Perda de massa

Cinco fatias de goiaba de cada tratamento foram selecionadas aleatoriamente e pesadas no início da vida de prateleira e a cada 2 dias de armazenamento. A perda de massa foi calculada para cada tratamento e convertida em porcentagem por meio da divisão do peso após o armazenamento pelo peso inicial registrado.

269. Determinação da firmeza

A firmeza das amostras foi determinada em texturômetro TA-TX2 (Texture Technologies Corp./Stable Micro systems) com célula de carga de 5 Kg e sonda cilíndrica de 5 mm de diâmetro (Aluminum Cylinder Probe SMS,P/25). As amostras foram comprimidas na região do mesocarpo da fruta, em 30 % da altura original, em um ciclo de compressão, com velocidade de pré-teste de 2 mm s⁻¹, teste de 1 mm s⁻¹ e pós-teste de 2 mm s⁻¹. Os índices de firmeza foram calculados a partir das curvas características do perfil de textura gerada no programa Texture Expert Stable Micro Systems, sendo os resultados expressos em Newton (N).

2.7. Análise estatística

Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado em parcelas subdivididas, em que nas parcelas foram avaliados os tratamentos e nas subparcelas os tempos de armazenamento. Os dados obtidos foram interpretados por análise de variância (ANOVA) utilizando teste F, teste t e teste de Tukey para comparação de médias e análise de regressão ao nível de 5 % de probabilidade. Para isso foi utilizado o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Viabilidade das culturas probióticas

Os tratamentos adicionados de revestimento comestível contendo culturas probióticas constatou-se que apresentaram contagem acima de 7,0 Log UFC g⁻¹

(Tabela 2). Segundo Kechagia et al. (2013), para um produto ser considerado probiótico ele deve conter uma concentração mínima de 6,0 Log UFC mL⁻¹ ou g⁻¹. Dessa forma pode-se afirmar que a goiaba minimamente processada revestida é um alimento potencialmente probiótico.

Tabela 2 – Contagem média de bactérias probióticas em goiaba minimamente processada revestidas durante 10 dias de armazenamento a 4 °C

Tratamentos	Número de células viáveis (Log UFC g ⁻¹)
GRC	0,00 ± 0,00 c
GRLP	7,95 ± 0,51 a
GRLPA	7,72 ± 0,44 a
GRLPLPA	7,08 ± 0,36 b

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

O período de armazenamento influenciou (p<0,05) a viabilidade das culturas probióticas e todos os tratamentos apresentaram redução da contagem durante os 10 dias de armazenamento a 4 °C (Figura 1). Mesmo com essa redução na contagem de células viáveis o produto obtido oferece ao consumidor em até 10 dias de armazenamento quantidade suficiente de bactérias probióticas para promover benefícios ao organismo hospedeiro, uma vez que o recomendado é que os produtos probióticos conttenham o mínimo de 6,0 Log UFC g⁻¹ destes micro-organismos para que os benefícios da sua ingestão sejam obtidos pelos consumidores (TRIPATHI; GIRI, 2014).

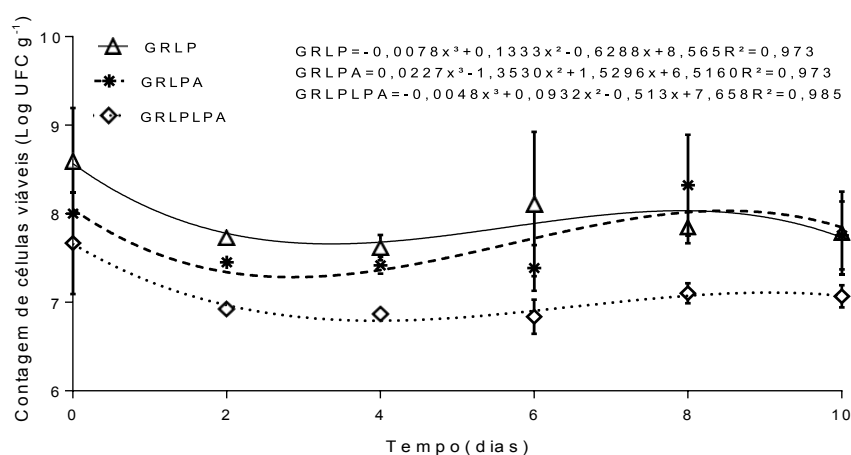


Figura 1 - Contagem de micro-organismos probióticos nas fatias de goiaba minimamente processada revestidas armazenadas por 10 dias a 4 °C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

3.2. Resistência das bactérias probióticas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

Constatou-se que as amostras revestidas submetidas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* apresentaram diminuição ($p < 0,05$) da contagem das bactérias probióticas ao longo do período de armazenamento (Figura 2). Verificou-se também que para todos os tratamentos avaliados é necessário um consumo mínimo de 100 gramas de goiaba minimamente processada revestidas para que o consumidor obtenha a quantidade ideal de bactérias probióticas.

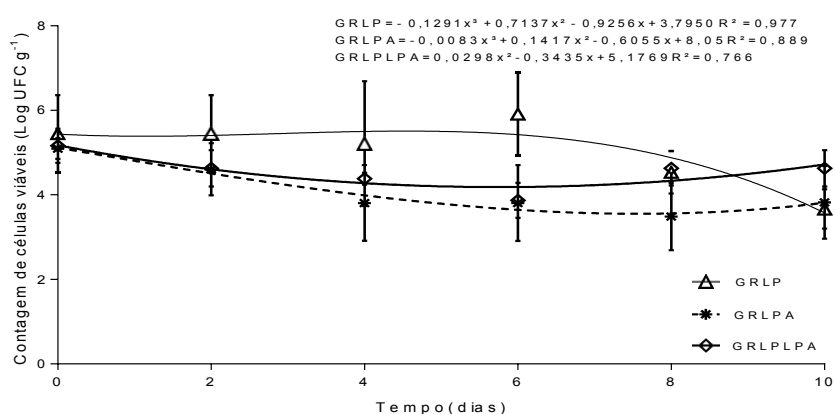


Figura 2 - Contagem de bactérias probióticas resistentes às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* ao longo do período de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

Pôde-se verificar também que logo após o processamento goiaba minimamente processada contendo revestimento comestível com *L. plantarum* (CH6072 e L286) foi a que apresentou a maior resistência (perda de 13,20%) às condições gastrointestinais simuladas, seguido do tratamento contendo *L. paracasei* BGP1 (perda de 21,33%) e do tratamento contendo a mistura de culturas probióticas (redução de 29,44%) (Figura 3). Apesar da redução na contagem de bactérias probióticas todos os tratamentos fornecem ao consumidor a quantidade mínima de 6,0 Log UFC g⁻¹ de micro-organismos probióticos desde que sejam ingeridos pelo menos 100 g do produto.

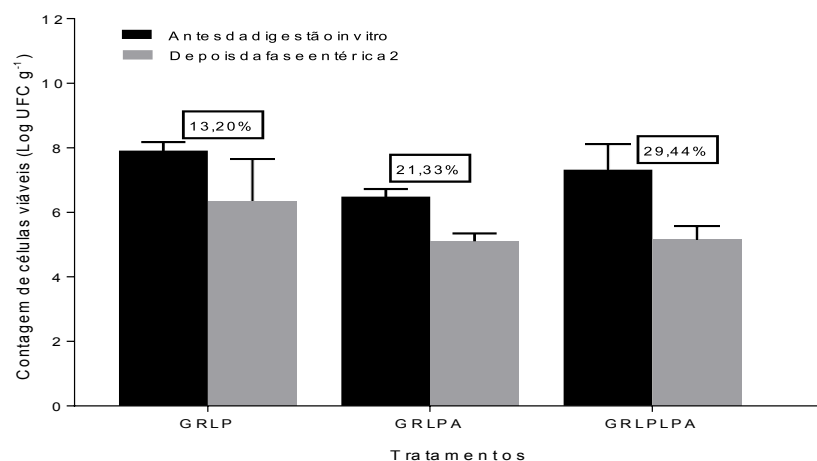


Figura 3 – Comparação da contagem padrão em placas de bactérias probióticas antes e após a simulação das condições gastrointestinais *in vitro* de goiaba minimamente processada logo após o processamento. GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Constatou-se por microscopia eletrônica de varredura completa incorporação das bactérias probióticas no revestimento comestível adicionado as goiabas minimamente processadas (Figura 4 – b, c e d) e que não houve modificação notável na adesão do revestimento a superfície da fruta. Em todos os casos os revestimentos a base de pectina de baixa metoxilação mantiveram sua estrutura coesa porém não uniforme sobre a superfície da fruta, caracterizado por alguns pontos onde houve rompimento do revestimento devido a etapa de desidratação necessária para a realização da análise de MEV.

Verificou-se também que as células bacterianas foram incorporadas na matriz do revestimento (pequenas formas no tipo de hastes, como indicado pelas setas) sem alteração de sua morfologia encontrando-se bem distribuídas por todo o tecido vegetal e com a capacidade de permanecer embutidas no revestimento comestível ao longo do período de armazenamento das goiabas minimamente processadas revestidas. Essas imagens demonstram que o revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação é uma matriz promissora para a incorporação e veiculação de *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura de *L. plantarum* (CH6072 e L286) e *L. paracasei* BGP1.

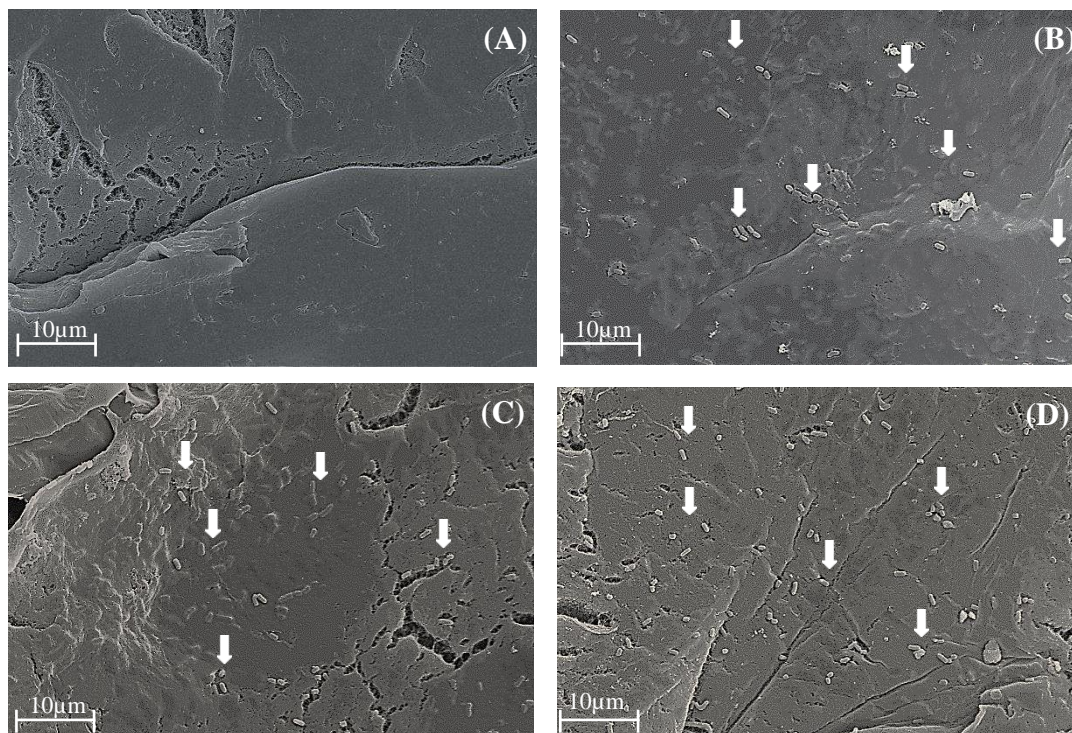


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de fatias de goiaba recobertas com revestimento de pectina de baixa metoxilação contendo bactérias probióticas ou não. (A) revestimento controle, (B) revestimento com *L. plantarum* (CH6072 e L286), (C) revestimento com *L. paracasei* BGP1, (D) revestimento mistura das culturas. As barras de escala são indicadas nas imagens com aumento de 781x (a), 4120x (b), 4500x (c), 4000x (d).

3.4. Atividade antimicrobiana dos revestimentos comestíveis adicionados na superfície de fatias de goiaba minimamente processada

Verificou-se que os revestimentos comestíveis de pectina adicionados das bactérias probióticas não apresentaram ($p > 0,05$) atividade antimicrobiana em relação à *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 (Tabela 3). Em estudo realizado anteriormente os revestimentos probióticos testados apresentaram antagonismo em teste *in vitro* contra essas bactérias (resultados não apresentados). Portanto, considera-se necessário um período de adaptação dos micro-organismos probióticos no revestimento antes de sua aplicação nos vegetais para que os compostos antimicrobianos sejam produzidos, liberados e tenham efeito contra micro-organismos indesejáveis.

Tabela 3 - Valores da contagem média (Log UFC g⁻¹) de *E. coli* e *L. innocua* em fatias de goiaba minimamente processada com revestimento contendo bactérias probióticas armazenadas a 4 °C

Tratamentos	<i>E. coli</i> ATCC11229 (Log UFC g ⁻¹)	<i>L. innocua</i> ATCC33090 (Log UFC g ⁻¹)
GRC	6,84 ± 0,76 a	6,62 ± 1,55 a
GRLP	6,72 ± 0,77 a	6,57 ± 1,48 a
GRLPA	6,78 ± 0,68 a	6,54 ± 1,61 a
GRLPLPA	6,27 ± 0,66 a	6,72 ± 1,66 a

a Letras iguais nas colunas indicam valores significativamente iguais (p>0,05) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

3.5. Qualidade microbiológica de goiaba minimamente processada adicionada de revestimento comestível

Os revestimentos comestíveis atuam como barreira, principalmente contra a excessiva perda de água e crescimento microbiano (FORATO et al., 2015). Constatou-se que não houve diferença (p>0,05) na contagem de fungos filamentosos e leveduras e de micro-organismos psicrotróficos entre os tratamentos (Tabela 4). Portanto, a adição de culturas probióticas ao revestimento não reduziu a contagem de micro-organismos deterioradores, no entanto, verifica-se uma contagem aceitável para o consumo durante toda a vida de prateleira das fatias de goiaba minimamente processada revestidas.

Também, constatou-se ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de goiaba minimamente processada adicionada de revestimento comestível durante todo o período de armazenamento do produto. Os diferentes tratamentos de goiaba minimamente processada revestida atenderam a RDC n. 12 (BRASIL, 2001) que estabelece padrões de segurança microbiológica para frutas frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.

Tabela 4 - Valores da contagem de bactérias psicotróficas e fungos filamentosos e leveduras em fatias de goiaba revestidas durante 10 dias de armazenamento a 4 °C

Tratamentos	Psicotróficos (Log UFC g ⁻¹)	Fungos Filamentosos e Leveduras (Log UFC g ⁻¹)
GRC	3,91 ± 1,96 a	2,54 ± 0,81 a
GRLP	3,44 ± 1,72 a	2,51 ± 0,78 a
GRLPA	3,27 ± 1,22 a	2,52 ± 1,18 a
GRLPLPA	3,84 ± 0,96 b	2,44 ± 0,59 a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

Ao longo do tempo de armazenamento, constatou-se aumento ($p < 0,05$) das bactérias psicotróficas e dos fungos filamentosos e leveduras ocorrendo um comportamento similar de crescimento para os todos os tratamentos (Figura 5).

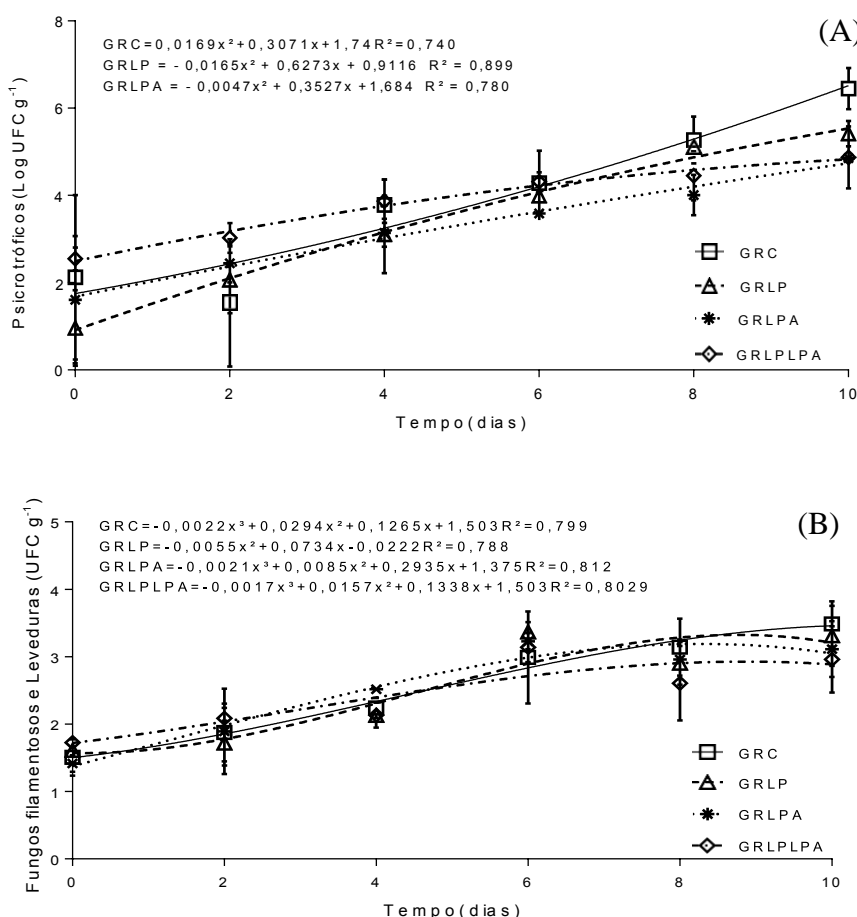


Figura 5 - Contagem de bactérias psicotróficas (A) e de fungos filamentosos e leveduras (B) de goiaba minimamente processada revestida ao longo do período de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

A goiaba minimamente processada recoberta com revestimento comestível a base de pectina de baixa metoxilação é um alimento seguro estando próprio para o consumo humano ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C e, a aplicação do revestimento comestível probiótico em goiaba é uma alternativa de alimento funcional de base não láctea para o consumidor.

3.6. Características físicas e químicas de goiaba minimamente processada adicionada de revestimento comestível

O revestimento comestível de pectina de baixa metoxilação apresentou boa adesão nas fatias de goiaba minimamente processada, conferindo brilho as frutas, além de não apresentar textura pegajosa e aroma após sua completa secagem.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para os parâmetros de pH, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis totais, perda de massa e firmeza. Assim, a adição de culturas probióticas nos revestimentos comestíveis não alterou as características da goiaba minimamente processada (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios das características físicas e químicas das fatias de goiaba minimamente processada revestidas e armazenadas a 4°C

Tratamentos	pH	ATT (%)	SST (°Brix)	Perda de massa (%)	Firmeza (N)
GRC	3,91 ± 0,09 a	8,43 ± 0,76 a	8,53 ± 0,90 a	4,53 ± 2,62 a	35,40 ± 4,91 a
GRLP	3,90 ± 0,07 a	8,35 ± 0,67 a	8,63 ± 0,92 a	4,14 ± 2,43 a	37,62 ± 7,07 a
GRLPA	3,93 ± 0,07 a	8,65 ± 0,69 a	8,50 ± 0,67 a	4,35 ± 2,72 a	35,07 ± 6,19 a
GRLPLPA	3,93 ± 0,06 a	8,31 ± 0,57 a	8,42 ± 0,66 a	3,78 ± 2,36 a	33,55 ± 6,62 a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

Com exceção do pH, todos os parâmetros avaliados para os diferentes tratamentos sofreram influência ($p < 0,05$) do período de armazenamento. Houve aumento ($p < 0,05$) da acidez total titulável durante a vida de prateleira de goiaba minimamente processada revestida pelos tratamentos controle e adicionados de culturas probióticas (Figura 6). Geralmente, durante a maturação, a acidez das frutas tende a diminuir, entretanto, pode ocorrer um aumento desse parâmetro em algumas variedades de goiaba uma vez que, durante o amadurecimento são produzidos ácidos orgânicos tais como ácido ascórbico,

ácido cítrico, ácido tartárico e ácido málico (MAHMOOD et al., 2012). O aumento da acidez total titulável durante o armazenamento também pode ocorrer devido ao baixo metabolismo respiratório dos vegetais gerando o acúmulo de ácidos nos vacúolos (ALVES et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Vishwasrao; Ananthanarayan (2016), avaliando goiaba revestida por hidroxipropilmetilcelulose.

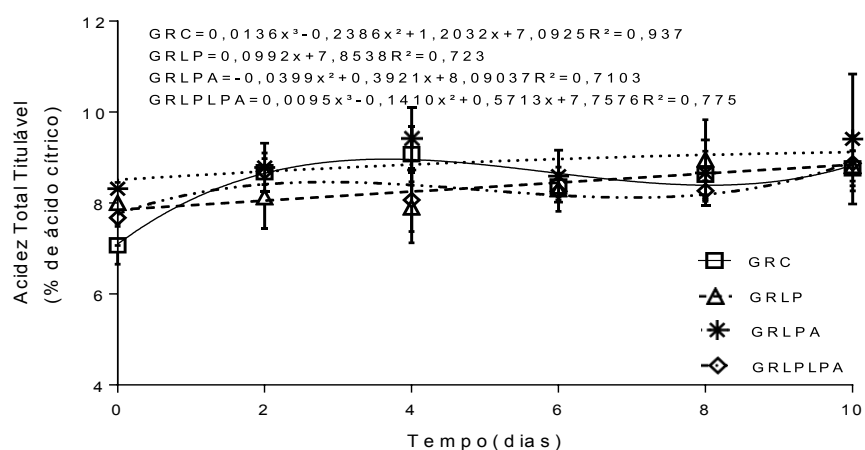


Figura 6 - Variação da acidez total titulável dos tratamentos avaliados (revestimentos controle e adicionados de culturas probióticas) ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

A redução de sólidos solúveis totais em frutas fatiadas revestidas tem sido associada por alguns autores com a redução da taxa respiratória e da atividade metabólica que ocorrem durante o armazenamento (GOL; PATEL; RAO, 2013), uma vez que, o abaixamento da taxa de respiração acarreta na diminuição da síntese e da utilização de metabólitos, resultando num menor teor de sólidos solúveis através da hidrólise mais lenta de carboidratos em açúcares (AQUINO; BLANK; SANTANA, 2015). No presente estudo, o teor de sólidos solúveis totais de todos os tratamentos reduziu ($p < 0,05$) durante o armazenamento refrigerado (Figura 7). Esses resultados demonstram que a pectina de baixa metoxilação tem propriedade filmogênica, resultando na formação de um revestimento semi-permeável em torno das fatias de goiaba minimamente processada, o que modifica a atmosfera do produto através da redução de O_2 e/ou elevação de CO_2 e reduz a evolução de etileno, o que acarreta numa menor redução do teor de sólidos solúveis.

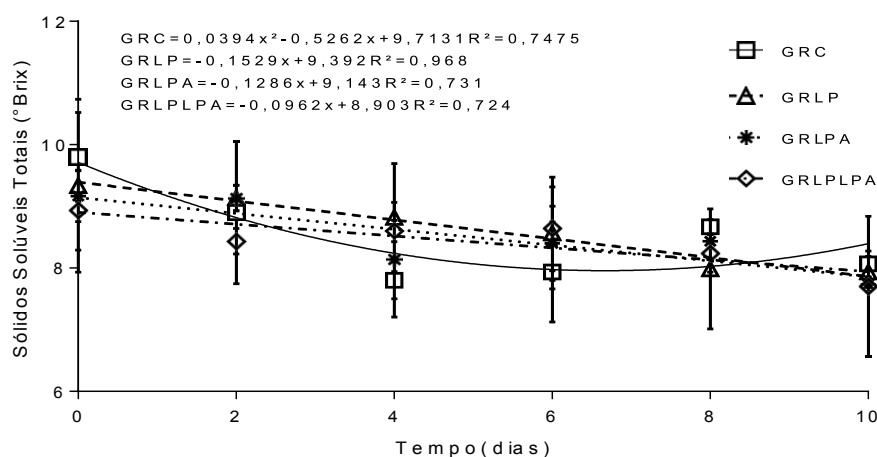


Figura 7 - Variação do teor de sólidos solúveis (°Brix) das fatias de goiaba revestidas (controle e adicionadas de culturas probióticas) ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

A perda de massa é considerada um indicador de frescor de frutas uma vez que ela ocorre, principalmente, como desidratação sendo mais acentuada em vegetais minimamente processados, já que a desidratação ocorre facilmente através do corte na superfície. Constatou-se no presente estudo que, a perda de massa aumentou significativamente ($p < 0,05$) ao longo do período de armazenamento em todos os tratamentos (Figura 8). Verificou-se que todos os tratamentos apresentaram perda de massa similar (Tabela 5) mostrando a eficácia do revestimento a base de pectina e que as culturas probióticas adicionadas não influenciaram ($p > 0,05$) a perda de massa das amostras. Constatou-se também que a perda de massa foi mais acentuada, em média de 5 %, a partir do 8º dia de armazenamento a 4º C. Resultados semelhantes foram encontrados por Vishwasrao; Ananthanarayan (2016), ao verificarem que goiabas revestidas com hidroxipropilmetilcelulose apresentaram uma controlada perda de massa.

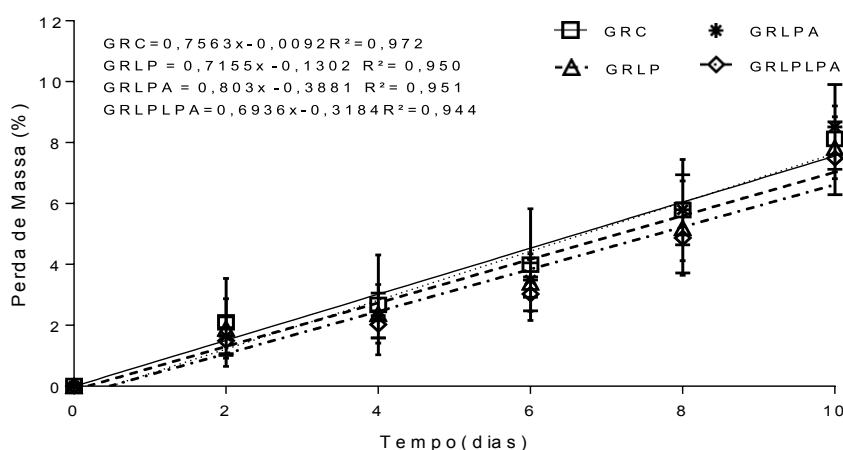


Figura 8 - Variação da perda de massa dos diferentes tratamentos de fatias de goiaba revestidas ao longo do período de armazenamento refrigerado. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

A firmeza é um dos atributos físicos mais importantes na manutenção da qualidade de vegetais minimamente processados e está associada ao amadurecimento dos vegetais. As fatias de goiaba minimamente processada dos tratamentos apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da firmeza ao longo do período de armazenamento (Figura 9).

Essa redução na firmeza das frutas é esperada, uma vez que durante o armazenamento continua ocorrendo à atividade de enzimas hidrolíticas, principalmente a pectinametilesterase e poligalacturonase, que promovem intensa solubilização dos constituintes da parede celular do vegetal. Além disso, nos tecidos vegetais lesionados ocorre aumento da produção de etileno, que acelera a deterioração e a senescência, promovendo um aumento na atividade enzimática sobre os componentes da parede celular, o que causa flacidez no tecido vegetal (FORATO et al., 2015).

Alterações na resposta mecânica de frutas também são atribuídas a transformações na estrutura celular do tecido durante o amadurecimento e senescência, por ocorrer um enfraquecimento das forças de união das células através da lamela média (CHIRALT et al., 2001), além da redução no teor de água, com conseqüente perda de turgor celular, contribuindo para a diminuição da firmeza das frutas (PERDONES et al. 2012). Estes resultados corroboram com os encontrados por Forato et al. (2015), que avaliaram goiabas revestidas com goma-carboximetilcelulose.

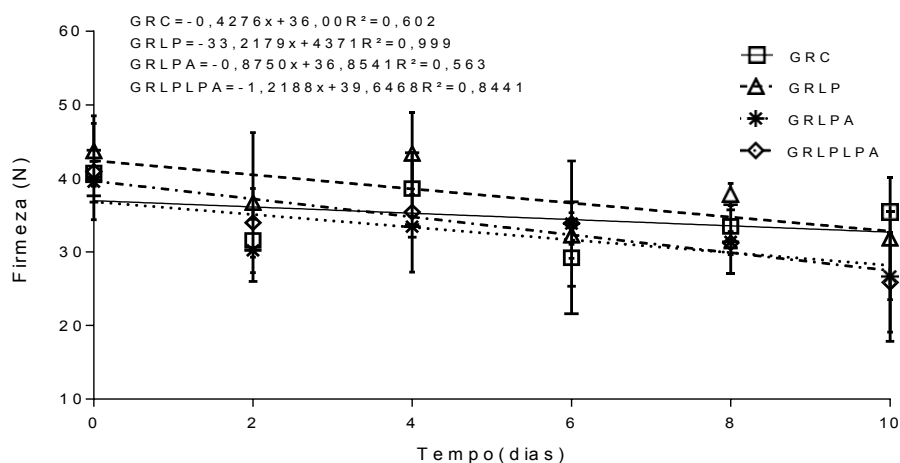


Figura 9 - Variação da firmeza (N) das fatias de goiaba dos diferentes tratamentos avaliados ao longo de 10 dias de armazenamento a 4 °C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

A partir da determinação da cor dos diferentes tratamentos (controle e adicionados de culturas probióticas) foi constatado que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras para todos os parâmetros avaliados (L^* , a^* , b^* , índice de escurecimento, chroma e hue) (Tabela 6).

Tabela 6 – Variações nos parâmetros de cor de fatias de goiaba revestidas com pectina (controle e adicionada de culturas probióticas) durante 10 dias de armazenamento a 4 °C

Tratamentos	Luminosidade (L^*)	Coordenada a^*	Coordenada b^*	Índice de		
				Escurecimento (IE)	Chroma (c^*)	Hue ($^{\circ}h$)
GRC	61,71 \pm 5,26 a	16,35 \pm 3,35 a	20,33 \pm 2,88 a	58,04 \pm 10,82 a	26,20 \pm 3,65 a	51,31 \pm 5,48 a
GRLP	60,76 \pm 2,35 a	18,19 \pm 3,11 a	19,13 \pm 1,48 a	58,42 \pm 5,82 a	26,47 \pm 2,79 a	46,82 \pm 4,39 a
GRLPA	67,29 \pm 2,38 a	14,43 \pm 2,89 a	20,39 \pm 1,95 a	50,93 \pm 6,45 a	25,07 \pm 2,68 a	54,92 \pm 4,48 a
GRLPLPA	64,78 \pm 3,47 a	14,91 \pm 2,72 a	21,26 \pm 2,40 a	55,80 \pm 8,53 a	26,04 \pm 3,03 a	55,09 \pm 4,48 a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

A cor é um importante indicador de maturação de frutas e é utilizada pelos consumidores durante a aquisição para concluir sobre sabor e frescor das mesmas. Além disso, a cor é uma propriedade fundamental da qualidade de frutas frescas fatiadas já que

as operações de descascamento e corte podem levar ao escurecimento enzimático, o que limitaria a vida de prateleira de frutas minimamente processadas.

A luminosidade das fatias de goiaba foi mensurada pela variação de escala da coordenada L*, onde valores tendendo a 100 representam um produto mais claro. Assim, os resultados obtidos indicam que as amostras tornaram-se mais escuras ao longo dos 10 dias de armazenamento a 4 °C uma vez que, os valores de L* diminuíram ($p < 0,05$) ao longo do tempo em todas as amostras (Figura 10).

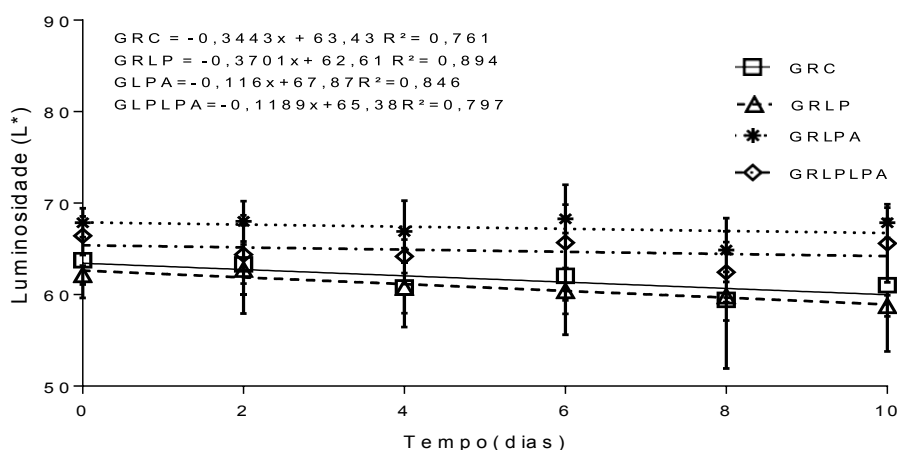


Figura 10 - Variação do parâmetro Luminosidade (L*) da cor das fatias de goiaba dos tratamentos avaliados ao longo do período de armazenamento refrigerado. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). GRC: Controle, GRLP: *L. plantarum*, GRLPA: *L. paracasei*, GRLPLPA: *L. plantarum* em combinação com *L. paracasei*.

Já as coordenadas a^* e b^* e ângulo hue não sofreram influência ($p > 0,05$) da vida de prateleira, o que indica que a tonalidade vermelha das goiabas no dia do processamento foi mantida ao longo dos 10 dias de armazenamento. O ângulo hue mostrou que os diferentes tratamentos apresentaram valores mais elevados, em média 52° , (próximo ao quadrante amarelo), indicando que a cor estava menos vermelha, isso é devido ao estágio de maturação ideal para produção de goiabas minimamente processadas.

Outro parâmetro da cor avaliado foi o índice Chroma (c^*), que explica a saturação ou intensidade da cor. Valores de Chroma menores correspondem ao padrão de cor mais fraco (“aspecto fosco do objeto”) e valores mais altos ao padrão de cor mais forte (“cores vivas”), sendo o padrão de cor mais forte o desejado para os alimentos (CARDOSO et al., 2007). Verificou-se neste trabalho que não houve diferença significativa entre as amostras o que demonstra que a adição das culturas probióticas nos revestimentos não influenciaram ($p > 0,05$) o padrão de cor das goiabas. Como o c^* assumi valores próximos

a zero para cores neutras (cinza) e ao redor de 60 para cores vívidas, constatou-se que fatias de goiaba minimamente processada revestidas apresentavam sua coloração mais próximas do intermediário (em média 26) entre as cores vívidas e cores neutras. Verificou-se também que o tempo de armazenamento não alterou ($p < 0,05$) a intensidade de chroma das amostras.

4. CONCLUSÕES

O revestimento comestível de pectina de baixa metoxilação mostrou ser eficiente para a veiculação de *L. plantarum* (CH6072 e L286), *L. paracasei* BGP1 e a mistura dessas culturas probióticas em goiaba minimamente processada. As fatias de goiaba minimamente processada adicionadas de revestimento comestível contendo probióticos apresentaram resistência em relação as condições de processamento, armazenamento e às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* sendo consideradas veículos de bactérias probióticas por até 10 dias de armazenamento a 4 °C, uma vez que os resultados de viabilidade encontrados foram similares aos de produtos lácteos disponíveis no mercado. A adição de revestimentos comestíveis a base de pectina de baixa metoxilação contendo culturas probióticas em goiaba minimamente processada não apresentou atividade antimicrobiana frente à *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090 e não alterou as características físicas e químicas do produto.

Portanto, levando em consideração o consumo crescente de frutas e hortaliças por parte da população, a goiaba minimamente processada revestida demonstra ser carreador adequado para a incorporação de culturas probióticas na dieta por assegurarem a quantidade mínima necessária de bactérias probióticas com a ingestão de, cerca de, 100 g de produto.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, J. A.; NASSUR, R. de C. M. R.; PIRES, C. R. F.; ALCÂNTARA, E. M. de; GIANNONI, J. A.; LIMA, L. C. de O. Cinética de degradação de vitamina C em mangas “Palmer” minimamente processadas armazenadas em diferentes temperaturas. **Ciência Agrotécnica**, v. 34, p. 714-721, 2010.

ANDREWS, W.H.; FLOWER, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. Salmonella. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 357-380, 2001.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 16. ed. Washington, DC, 2000.

AQUINO, A. B.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. Impact of edible chitosan–cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. **Food Chemistry**, v. 171, p. 108–116, 2015.

BAYARRI, M., OULAHAL, N., DEGRAEVE, P., & GHARSALLAOUI, A. Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. **Journal of Food Science**, v. 131, p. 18-25, 2014.

BERISTAIN-BAUZA, S. C.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 12 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.

CARDOSO, W. S.; PINHEIRO, F. A.; PATELLI, T.; PEREZ, R.; RAMOS, A. M. Determinação da concentração de sulfito para a manutenção da qualidade da cor em maçã desidratada. **Revista Analytica**, v. 29, p. 66-72, 2007.

CHANDRAHASA, V.; LAXMIA, A. Delayed post-harvest ripening-associated changes in *Manilkara zapota* L. var. *Kalipatti* with composite edible coating. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 536–542, 2016.

CHIRALT, A.; MARTINEZ-NAVARRETE, N.; MARTINEZ-MONZO, J.; TALENS, P.; MORAGA, G.; AYALA, A.; FITO, P. Changes in mechanical properties throughout osmotic processes: Cryoprotectant effect. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 129–135, 2001.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association – APHA, p. 159-166, 2001.

DA SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. M.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 144-158, 2016.

DOWES, F. P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association - APHA, DC., 2001. 676 p.

FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Report, 2002.

FORATO, L. A.; BRITTO, D.; RIZZO, J. S.; GASTALDIA, T. A.; ASSIS, O. B. G. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 5, p. 68–74, 2015.

GILLA, K. S.; DHALIWALB, H. S.; MAHAJANC, B. V. C.; PALIYATHD, G.; BOORAE, R. S. Enhancing postharvest shelf life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda by pre-harvest application of hexanal containing aqueous formulation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 224–232, 2016.

GOL, N. B.; PATEL, P. R.; RAO, T. V. R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 185–195, 2013.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

KHARE, A. K.; ABRAHAM, R. J. J.; RAO, V. A.; BABU, R. N. Utilization of carrageenan, citric acid and cinnamon oil as an edible coating of chicken fillets to prolong its shelf life under refrigeration conditions. **Veterinary World**, v. 9, p. 166-175, 2016.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate–chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1–16, 2007.

LÓPEZ DE LACEY, A. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 277–282, 2012.

MAHMOOD, T.; ANWAR, F.; ABBAS, M.; BOYCE, M. C.; SAARI, N. Compositional variation in sugars and organic acids at diferente maturity stages in selected small fruits from Pakistan. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 1380-1392, 2012.

MITSUOKA, T. Development of functional foods. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, p. 117-128, 2014.

MOREIRA, M. R.; ÁLVAREZ, M. V.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effects of pulsed light treatments and pectin edible coatings on the quality of fresh-cut apples: a hurdle technology approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 261–268, 2016.

PERDONES, A.; SANCHEZ-GONZALEZ, L.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32–41, 2012.

RICHER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed., Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 483-496, 2001.

SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; GAN, H.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; PARMENTER, C.; FISK, I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 231-242, 2014.

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.

VALDÉS, A.; BURGOS, N.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. Review: Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. **Coatings**, v. 5, p. 865-886, 2015.

VISHWASRAO, C. E.; ANANTHANARAYAN, L. Postharvest shelf-life extension of pink guavas (*Psidium guajava* L.) using HPMC-based edible surface coatings. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1966–1974, 2016.

CONCLUSÃO GERAL

Os revestimentos comestíveis a base de pectina de baixa metoxilação apresentaram-se como bons transportadores de bactérias probióticas. Além disso, alguns revestimentos adicionados de probióticos apresentaram capacidade antimicrobiana *in vitro* contra *E. coli* ATCC11229 e *L. innocua* ATCC33090, o que demonstra efetividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Os revestimentos obtidos apresentaram boa adesão em cenoura e goiaba minimamente processadas o que possibilita o estudo de sua adição em outras frutas e hortaliças, uma vez que as bactérias probióticas mantiveram viáveis quando o revestimento comestível foi adicionado aos vegetais sem que houvesse grandes alterações das características físicas e químicas dos mesmos.

As frutas e hortaliças recobertas com o revestimento comestível adicionado de probióticos é uma nova alternativa de produto potencialmente probiótico de base não láctea acessível a toda população.