

ELIANE MAURÍCIO FURTADO MARTINS

**VIABILIDADE DO USO DE SALADA DE FRUTAS MINIMAMENTE
PROCESSADA COMO VEÍCULO DE MICRO-ORGANISMOS
PROBIÓTICOS**

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
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M386v
2012

Martins, Eliane Maurício Furtado, 1979-
Viabilidade do uso de salada de frutas minimamente
processada como veículo de micro-organismos probióticos /
Eliane Maurício Furtado Martins. – Viçosa, MG, 2012.
xv, 84f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Afonso Mota Ramos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 70-84

1. Frutas - Processamento. 2. Probióticos. 3. Lactobacilo.
4. Estudos de viabilidade. 5. Microscopia eletrônica.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.804

ELIANE MAURÍCIO FURTADO MARTINS

**VIABILIDADE DO USO DE SALADA DE FRUTAS MINIMAMENTE
PROCESSADA COMO VEÍCULO DE MICRO-ORGANISMOS
PROBIÓTICOS**

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: 13 de julho de 2012

Prof^a Ellen Silva Lago Vanzela

Prof. José Manoel Martins

Prof. Paulo César Stringheta
(Coorientador)

Dr^a. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
(Coorientadora)

Prof. Afonso Mota Ramos
(Orientador)

Aos meus pais Hélio e Cecília,
pelo carinho.

Ao Maurílio,
Pelo amor, companheirismo e apoio incondicional.

À Isadora,
Meu “alecrim dourado”, razão da minha vida, por cada sorriso.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso de doutorado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Câmpus Rio Pomba, pelo auxílio e disponibilidade de utilização dos laboratórios e da Unidade de Processamento de Frutas, para realização de parte dos experimentos.

Ao meu orientador, professor Afonso Mota Ramos, por ter me apoiado na escolha do tema e por acreditar que seria possível introduzir as culturas probióticas nas saladas de frutas. Além disso, agradeço pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos, estímulo, colaboração e pela excelente convivência e amizade.

À doutora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da EPAMIG, pelas valiosas sugestões e discussões que promoveram o enriquecimento deste trabalho, além da agradável convivência e amizade.

Ao professor Paulo César Stringheta, pelos ensinamentos que motivaram o estudo e a execução dos experimentos.

À professora Célia Lúcia de Lucas F. Ferreira pelas sugestões e contribuição na realização deste trabalho.

Aos professores Ellen e José Manoel, pelas valiosas sugestões e colaboração desde a qualificação até a defesa da tese.

À professora Cida Antunes, pelas prazerosas discussões e auxílio na microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus pais, Hélio e Cecília, amores de minha vida, pelo incentivo e pela dedicação e esforço que tornaram possível minha formação.

Ao meu esposo Maurilio, medalha de ouro que ganhei nas olimpíadas da vida, pelo carinho e companheirismo, além de ótimas sugestões que foram indispensáveis a cada momento da realização do trabalho.

À minha filhinha Isadora, meu alecrim dourado, amor infinito de minha vida, pelos mais lindos sorrisos e gostosos abraços que amenizaram as dificuldades encontradas neste período.

A todos os amigos, companheiros de Curso e de laboratório da UFRV, representados por Mirella, Ligia, Anderson, Marcos, Érica, Túlio, Marcela,

Welliton, Isadora Rebouças, Rita, Cristiane, Simone, Paula e tantos outros aqui não citados, pela amizade, pelo apoio e pela agradável convivência.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, de modo especial a Geralda, pela agradável convivência e serviços prestados.

Ao Núcleo de Microscopia e Micro-análise da UFV, aqui representados por Gilmar, Carla e Patrícia que nos auxiliaram na microscopia de varredura, fazendo-nos descobrir as particularidades do tecido vegetal.

À Chr. Hansen e Danisco pela doação das culturas probióticas.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Câmpus Rio Pomba do IF Sudeste MG, e ao amigo e professor André Narvaes pelo auxílio e sugestões durante a execução do trabalho.

Ao Joaquim, nosso querido “J”, técnico da Unidade de Processamento de Frutas, pelo apoio, consideração, amizade e auxílio constante.

Ao Jonathan, Rosélio e Daniel pelo auxílio.

Aos meus queridos estagiários e estudantes de Iniciação científica, Bruno, Patrícia, Cínthia, Cris, Vanessa, pelo apoio e auxílio na execução dos experimentos fazendo nossos dias mais felizes.

À Diana, ex-aluna e co-orientada de iniciação científica, e ao professor Maurilio por ter dado o ponta-pé inicial nos estudos de probióticos em frutas e hortaliças no Câmpus Rio Pomba, fazendo-nos despertar para os inúmeros desafios e prazeres deste tema.

Às amigas Eliseth e Simone Quintão, que mesmo a distancia fazem parte da minha vida.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

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

Eliane Maurício Furtado Martins, filha de Hélio Martins Furtado e Maria Cecília Maurício Furtado, nasceu em Rio Pomba, Minas Gerais no dia 15 de dezembro de 1979.

Em agosto de 2003, graduou-se como Economista Doméstica pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. No período de 2001 a 2003 foi bolsista de iniciação científica (PIBIC/CNPq) no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (CCB/DBB) e trabalhou com Extração, Purificação e Caracterização Bioquímica de Peptídeos Antimicrobianos de Soja.

Em agosto de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa onde concentrou seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos concluindo o mesmo em 2005.

Em 2006 atuou com *Trainee* e Assistente de Laboratório no Departamento de Microbiologia da Universidade de Zürich, Suíça, onde desenvolveu experimentos relacionados ao mecanismo de comunicação entre células (*quórum sensing*).

Desde 2007 atua como professora no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas, IF Sudeste MG, Câmpus Rio Pomba, onde ministra disciplinas e desenvolve pesquisas nas áreas de processamento de frutas e hortaliças, processamento mínimo e uso de culturas probióticas em produtos de origem vegetal.

Em 2008 iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa concentrando seus estudos na adição de culturas probióticas em frutas minimamente processadas.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE FIGURAS | Viii |
| LISTA DE TABELAS | X |
| RESUMO | Xii |
| ABSTRACT | Xiv |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REVISÃO de LITERATURA | 3 |
| 2.1. Alimentos funcionais..... | 3 |
| 2.2. Produção de frutas no Brasil..... | 5 |
| 2.3. Frutas e hortaliças minimamente processadas..... | 5 |
| 2.4. Probióticos | 8 |
| 2.4.1. Principais gêneros de bactérias probióticas: <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> | 9 |
| 2.4.2. Benefícios do consumo de bactérias probióticas para a saúde humana | 11 |
| 2.4.3. Prebióticos..... | 14 |
| 2.5. Aplicação industrial de bactérias probióticas em produtos de origem vegetal..... | 15 |
| 2.5.1. Sucos..... | 16 |
| 2.5.2. Produtos minimamente processados | 21 |
| 2.5.3. Hortaliças cruas e fermentadas | 22 |
| 2.5.4. Cereais..... | 24 |
| 2.5.5. Café e chocolate | 26 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1. Processamento mínimo das frutas e elaboração da salada de frutas..... | 28 |
| 3.2. Inoculação de culturas probióticas na salada de frutas..... | 28 |
| 3.3. Tratamento da salada de frutas com compostos inibidores do escurecimento | 29 |
| 3.4. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO)..... | 30 |
| 3.5. Determinação de cor | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.6. Determinação da viabilidade das culturas probióticas em salada de frutas minimamente processadas | 31 |
| 3.7. Avaliação da adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos em salada de frutas ao longo do tempo de armazenamento | 32 |
| 3.7.1. Preparo das amostras..... | 33 |
| 3.7.2. Desidratação das amostras e metalização com ouro..... | 33 |
| 3.8. Determinação de textura..... | 33 |
| 3.9. Análises físico-químicas | 34 |
| 3.9.1. Determinação de pH, acidez e teor de sólidos solúveis (°Brix)..... | 34 |
| 3.9.2. Determinação de vitamina C | 34 |
| 3.9.3. Determinação de carotenóides totais..... | 35 |
| 3.10. Análises microbiológicas..... | 35 |
| 3.11. Análise sensorial das saladas de frutas..... | 36 |
| 3.12. Análise estatística | 37 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 4.1. Determinação de PPO e cor da salada de frutas contendo <i>L. acidophilus</i> e compostos inibidores do escurecimento..... | 39 |
| 4.2. Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> na salada de frutas contendo os agentes inibidores do escurecimento em maiores concentrações..... | 43 |
| 4.3. Viabilidade de micro-organismos probióticos em salada de frutas minimamente processadas ao longo do armazenamento..... | 45 |
| 4.4. Avaliação da adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos ao tecido das frutas por microscopia eletrônica de varredura..... | 47 |
| 4.5. Determinação de textura das frutas utilizadas na salada..... | 56 |
| 4.6. Características físico-químicas das saladas de frutas | 60 |
| 4.6.1. Vitamina C e carotenóides totais das saladas de frutas..... | 61 |
| 4.7. Características microbiológicas das saladas de frutas..... | 65 |
| 4.8. Aceitabilidade sensorial das saladas de frutas | 66 |
| 5. CONCLUSÃO | 68 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Equação de regressão e coeficiente de determinação das coordenadas L* (A), a* (B) e b* (C) de saladas de frutas minimamente processadas submetidas a diferentes tratamentos por 3 minutos a 5 °C e armazenadas por 120 horas..... | 41 |
| Figura 2 – Equação de regressão e coeficiente de determinação do índice de cor (IC) das saladas de frutas minimamente processadas submetidas a diferentes tratamentos por 3 minutos a 5 °C e armazenadas por 120 horas..... | 42 |
| Figura 3 - Regressão da viabilidade dos micro-organismos probióticos em saladas de frutas em função do tempo de armazenamento..... | 46 |
| Figura 4 – Fotomicrografia da superfície de banana (A) e de maçã (B) logo após o processamento mínimo (tempo 0) com sítios (indicados por setas) com potencial para adesão microbiana..... | 48 |
| Figura 5 – <i>L. rhamnosus</i> aderidos à superfície das frutas abacaxi (A), banana (B) e goiaba (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento..... | 50 |
| Figura 6 – <i>L. rhamnosus</i> aderidos à superfície das frutas maçã (A), mamão (B) e manga (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento..... | 51 |
| Figura 7 – <i>L. acidophilus</i> aderidos à superfície das frutas abacaxi (A), banana (B) e goiaba (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento..... | 52 |
| Figura 8 – <i>L. acidophilus</i> aderidos à superfície das frutas maçã (A), mamão (B) e manga (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento..... | 53 |
| Figura 9 – <i>L. plantarum</i> aderidos à superfície das frutas abacaxi (A), banana (B) e goiaba (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento..... | 54 |
| Figura 10 – <i>L. plantarum</i> aderidos à superfície das frutas maçã (A), mamão (B) e manga (C) logo após o processamento das saladas | |

| | |
|--|----|
| (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento..... | 55 |
| Figura 11- Equação de regressão e coeficiente de determinação de textura de manga e mamão na salada de frutas controle e contendo <i>L. rhamnosus</i> em função do tempo de armazenamento..... | 58 |
| Figura 12 - Equação de regressão e coeficiente de determinação de textura de mamão e banana na salada de frutas controle e contendo <i>L. plantarum</i> em função do tempo de armazenamento..... | 58 |
| Figura 13 - Equação de regressão e coeficiente de determinação de textura de mamão, banana e maçã na salada de frutas controle e contendo <i>L. acidophilus</i> em função do tempo de armazenamento..... | 59 |
| Figura 14 - Equação de regressão e coeficiente de determinação de vitamina C em função do tempo de armazenamento de saladas de frutas controle e contendo <i>L. rhamnosus</i> | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Estudos recentes sobre a utilização de matrizes vegetais para veiculação de bactérias probióticas..... | 17 |
| Tabela 2 - Resultados médios para determinação de PPO e de cor (L*, a*, b*, IC, IE, c* e h°) de saladas de frutas adicionadas de compostos inibidores do escurecimento (tratamentos)..... | 40 |
| Tabela 3 – Média da contagem de bactérias lácticas (Log UFC/g) em salada de frutas minimamente processadas adicionadas de compostos inibidores do escurecimento, após 0 e 120 horas de processamento e armazenamento a 8 °C | 44 |
| Tabela 4 - Médias da contagem (Log UFC/g) de bactérias probióticas em salada de frutas minimamente processadas em diferentes tempos de armazenamento..... | 45 |
| Tabela 5 - Resultados médios (n=12) de firmeza (N) das frutas utilizadas em salada dos tratamentos controle e contendo <i>L. rhamnosus</i> | 57 |
| Tabela 6 - Resultados médios (n=12) de firmeza (N) das frutas utilizadas em salada dos tratamentos controle e contendo <i>L. plantarum</i> | 57 |
| Tabela 7 - Resultados médios (n=12) de firmeza (N) das frutas utilizadas em salada dos tratamentos controle e contendo <i>L. acidophilus</i> | 57 |
| Tabela 8 - Resultados médios de pH, acidez e teor de sólidos solúveis (°Brix) de saladas de frutas minimamente processadas dos tratamentos controle e contendo bactérias probióticas em diferentes tempos de armazenamento..... | 60 |
| Tabela 9 – Resultados médios de vitamina C (mg/100g) nas saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo <i>L. rhamnosus</i> ao longo do período de estocagem a 8 °C..... | 61 |
| Tabela 10 - Médias (n=8) de carotenóides totais de saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo <i>L. rhamnosus</i> logo após o | |

| | |
|---|----|
| processamento (tempo 0 h) e após 120 h a 8 °C..... | 63 |
| Tabela 11 - Média da contagem (n=3) de micro-organismos psicrotróficos (Log UFC/g), do número mais provável de coliformes a 30 °C e a 45 °C (NMP/g) e análise de <i>Salmonella</i> em saladas de frutas controle e contendo culturas probióticas..... | 64 |
| Tabela 12 - Médias dos atributos cor, sabor e impressão global de saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo <i>L. rhamnosus</i> logo após o processamento (tempo 0 h) e após 120 h de armazenamento a 8 °C..... | 67 |

RESUMO

MARTINS, Eliane Maurício Furtado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Viabilidade do uso de salada de frutas minimamente processada como veículo de micro-organismos probióticos.** Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadores: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e Paulo César Stringheta.

Estudos mostram que a matriz vegetal pode carrear culturas probióticas. Assim, a viabilidade de utilização de saladas de frutas minimamente processadas como veículo de *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* LA-5 e *L. plantarum* foi objeto de estudo deste trabalho. Objetivou-se também avaliar a eficiência de compostos redutores a fim de retardar o escurecimento das frutas; determinar a viabilidade das bactérias probióticas no produto; verificar sua adesão nas frutas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e determinar características físico-químicas, vitamina C, carotenóides totais, características microbiológicas e sensoriais da salada ao longo do armazenamento. Foram avaliados 4 antioxidantes na salada de frutas adicionada de *L. acidophilus*. Análises de polifenoloxidase (PPO) e cor foram realizadas. Avaliou-se também a viabilidade das culturas probióticas e a adesão por MEV. Determinou-se pH, acidez, sólidos solúveis, textura, vitamina C, carotenóides totais, psicotróficos, coliformes a 30 °C e 45 °C e *Salmonella* sp. na salada de frutas. Para a análise sensorial utilizou-se escala hedônica de 9 pontos. Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) da atividade de PPO entre a salada de frutas controle e as tratadas com ácido ascórbico 1 % e 2 % e cloridrato de cisteína 0,5 % e 1 %, sendo o ácido ascórbico 1 % selecionado como agente inibidor do escurecimento da salada. A cor das frutas foi afetada pelo processamento e pelo período de armazenamento. A viabilidade de *L. acidophilus* nas saladas contendo os compostos inibidores em maiores concentrações foi acima de 7,43 Log UFC/g até o quinto dia de estocagem. Constatou-se ainda que *L. rhamnosus* foi a cultura de maior viabilidade ($p < 0,05$) na salada de frutas, apresentando 8,49 Log UFC/g durante o período de armazenamento do produto. Constatou-se por MEV que os tecidos das frutas danificados pelo processamento serviram de abrigo para as culturas probióticas, constituindo-se em sítios de adesão. Observou-se ainda alto número de *L. rhamnosus*, *L.*

acidophilus e *L. plantarum* aderidos à superfície das frutas. Verificou-se maior adesão das culturas probióticas em banana, maçã e goiaba. Constatou-se também que a adição de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* não alterou a textura das frutas presentes na salada ($p>0,05$). As saladas de frutas adicionadas de *L. rhamnosus* apresentaram valores de pH e acidez diferentes das saladas de frutas do tratamento controle ($p<0,05$). Houve redução do teor de vitamina C ao longo do tempo, sendo que as saladas contendo *L. rhamnosus* apresentaram maior conteúdo de vitamina C ($p<0,05$) comparada ao tratamento controle, até as 72 horas de armazenamento, devido as frutas deste tratamento serem imersas em solução de ácido ascórbico 1 %, que contribuiu para enriquecer a salada de frutas. Não se observou degradação significativa ($p>0,05$) de carotenóides totais ao longo do período de armazenamento. As saladas de frutas contendo culturas probióticas apresentaram contagens de micro-organismos psicotróficos de, no mínimo, 2,0 Log UFC/g inferiores às saladas controle por até 120 horas de armazenamento a 8 °C. Além disso, a salada atendeu aos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente. As saladas de frutas controle e contendo *L. rhamnosus* foram bem aceitas pelos consumidores, com notas acima de 7,0, gostei moderadamente, na escala hedônica de nove pontos para os atributos cor, sabor e impressão global. Portanto, saladas de frutas podem ser usadas como um veículo promissor de bactérias probióticas e representam uma alternativa de consumo de alimentos funcionais para a população.

ABSTRACT

MARTINS, Eliane Maurício Furtado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Viability of the use of minimally processed fruit salad as a vehicle of probiotics microorganisms.** Adviser: Afonso Mota Ramos. Co-advisers: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto and Paulo César Stringheta.

Studies show that the vegetable matrix can carry probiotic cultures. Thus, the feasibility of using minimally processed fruit salads as a vehicle for *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* LA-5 and *L. plantarum* was the subject of this work. Moreover, we aimed to evaluate the effect of reducing compounds in order to retard the browning of fruits and determine the viability of probiotic bacteria in the product, verify its adhesion in fruits by electron microscopy (SEM) and determine the physico-chemical, vitamin C, carotenoids, microbiological and sensory characteristics of the salads during cold storage. We evaluated four antioxidants in fruit salad added of *L. acidophilus*. Analysis of polyphenol oxidase (PPO) and color were made. We also evaluated the viability of the probiotic cultures and accession by SEM. It was determined pH, acidity, soluble solids, texture, vitamin C, carotenoids, psychrotrophs, coliforms at 30 °C and 45 °C and *Salmonella* sp. in fruit salad. Hedonic scale of 9 points was used for sensorial analysis. There was significant difference ($p < 0.05$) in PPO activity between control fruit salads and treated with ascorbic acid 1 % and 2 % and cysteine hydrochloride 0.5 % and 1 %. Ascorbic acid 1 % was selected as an inhibitor of browning of salad. The color of the fruit was affected by the processing and storage. The viability of *L. acidophilus* in salads containing inhibitor compounds at higher concentrations was above 7.43 log CFU/g until the fifth day of storage. It was further observed that *L. rhamnosus* was the culture of greater viability ($p < 0.05$) in fruit salads, with 8.49 log CFU/g during product storage. It was observed by SEM that the tissues of fruit damaged by processing served as a shelter for probiotic cultures, which makes it an adhesion sites. We also observed a high number of *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* and *L. plantarum* adhered to the surface of the fruit. There was greater adhesion of probiotic cultures in banana, apple and guava. It was also found that the addition of *L. rhamnosus* and *L. plantarum* did not alter the texture present in the fruit salad ($p > 0.05$). The fruit salad added of *L. rhamnosus* showed values of pH and

acidity different from the control treatment ($p < 0.05$). There was a reduction of vitamin C content over time, and salads containing *L. rhamnosus* showed a higher content of vitamin C ($p < 0.05$) compared to control treatment, up to 72 hours of storage, because the fruits of this treatment were immersed in 1% of ascorbic acid, which contributed to enrich the fruit salad. No significant degradation ($p > 0.05$) of total carotenoids was observed during the storage period. The fruit salads containing probiotic cultures presented the counts of psychrotrophic microorganisms of at least 2.0 log CFU/g lower than salads control for 120 hours of storage at 8 °C. In addition, the salads were in agreement with the microbiological standards established by Brazilian law. The control fruit salads and containing *L. rhamnosus* were well accepted by consumers, with scores above 7.0, like moderately, in the nine point hedonic scale for the attributes color, flavor and overall liking. Therefore, fruit salads can be used as a promising vehicle for probiotic bacteria and represent an alternative to the consumption of functional foods for the population.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As frutas e hortaliças são alimentos que apresentam em sua constituição quantidades significativas de vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes que contribuem para uma dieta saudável. Entretanto, o volume de perdas desses produtos no Brasil provocados por danos mecânicos, manuseio inadequado, ferimentos, rachaduras e abrasões é significativo. Acredita-se que a redução de perdas e desperdícios de frutas e hortaliças seria possível mediante o estímulo ao processamento do alimento.

Assim, como alternativa para redução de desperdícios, agregação de valor aos produtos e em atendimento ao perfil do consumidor moderno que tem exigido qualidade, praticidade e segurança, foi desenvolvida a tecnologia de processamento mínimo. Os produtos minimamente processados são basicamente frutas e hortaliças submetidas a diferentes alterações físicas que facilitam seu consumo, mantendo sua qualidade semelhante à do produto fresco.

Esses produtos apresentam um mercado promissor, sobretudo nos grandes centros urbanos e são notáveis os esforços de pesquisadores e instituições de ensino e pesquisa para estimular o crescimento deste segmento no país, por meio do incentivo ao desenvolvimento de pesquisas técnico-científicas e parcerias com o setor produtivo. Dentre as inovações na área, os micro-organismos probióticos têm sido utilizados em frutas e hortaliças frescas como promotores de saúde e vêm ganhando destaque entre pesquisadores e especialistas da área de nutrição, em função dos benefícios associados ao consumo, uma vez que esses micro-organismos afetam benéficamente o organismo hospedeiro por meio do balanço da microbiota intestinal e, dentre eles, aqueles pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são os mais comumente utilizados como probióticos na alimentação humana.

Os produtos lácteos fermentados são, geralmente, boas matrizes veiculadoras destes micro-organismos. Entretanto, estes produtos não são consumidos por indivíduos vegetarianos, intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite e por aqueles que necessitam de uma dieta de baixo teor

de colesterol, como os hipercolesterolêmicos. Assim, outros alimentos, como aqueles a base de vegetais tem sido estudados com potencial veículo dos micro-organismos probióticos, sendo os resultados promissores.

As frutas minimamente processadas são bem aceitas pela maioria dos consumidores em função da praticidade que oferecem, uma vez que não necessitam das etapas de preparo para serem consumidas. Portanto, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a viabilidade de micro-organismos probióticos e seu uso em salada de frutas minimamente processadas, visando oferecer uma alternativa de consumo de produto minimamente processado com alegações de propriedades funcionais.

Especificamente objetivou-se:

- Avaliar a eficiência de diferentes compostos redutores a fim de retardar o escurecimento enzimático das frutas utilizadas no preparo da salada;
- Determinar a viabilidade de micro-organismos probióticos em salada de frutas minimamente processadas armazenada a 8 °C;
- Verificar a adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos na salada de frutas por microscopia eletrônica de varredura ao longo do tempo de armazenamento;
- Determinar textura, características físico-químicas, vitamina C, carotenóides totais, características microbiológicas e sensoriais de salada de frutas adicionada de micro-organismos probióticos ao longo do tempo de armazenamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alimentos funcionais

O papel influente da indústria de alimentos sobre a dieta e estilo de vida da população vem acompanhado do desafio de atender a demanda dos consumidores por produtos que sejam saborosos, visualmente atrativos e que, ao mesmo tempo, promovam saúde e bem estar. Entre esses alimentos estão aqueles conhecidos como funcionais, por resultarem em benefícios de saúde comprovados, além dos efeitos nutricionais já conhecidos (SAAD et al., 2011).

O interesse pelos alimentos funcionais é crescente e tem atraído a atenção dos consumidores e da indústria de alimentos. O mercado de alimentos funcionais no Brasil representa, aproximadamente, 15% do mercado de alimentos, com crescimento anual de, aproximadamente, 20%. Este mercado, embora promissor, apresenta um grande desafio que é conquistar a confiança do consumidor quanto às suas alegações funcionais, assegurando que não se trata simplesmente de uma estratégia de mercado para justificar o aumento de preço dos produtos (ROSA; COSTA, 2010).

O termo alimentos funcionais foi introduzido pelo governo Japonês em meados dos anos 1980, como resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (ARAYA; LUTZ, 2003). No Japão, a definição legal de alimento funcional foi estipulada de acordo com o Sistema “Alimento Destinado para Uso Específico de Saúde” (*Food for Specific Health Use – FOSHU*) da legislação de alimentos japonesa, referindo-se como alimentos usados como parte de uma dieta normal que demonstram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções nutricionais básicas (STRINGHETA et al., 2007).

Países como Canadá, Estados Unidos, Austrália e da União Européia começaram a identificar e definir os alimentos funcionais como ingredientes naturais que atuam na melhoria de determinadas vias metabólicas. Entretanto, somente no Japão a expressão “alimento funcional” é definida

por lei. Neste país, com base no conhecimento sobre a relação entre o alimento ou seus componentes e a saúde, os alimentos funcionais recebem selo de certificação com essa garantia (JONES; VARADY, 2008).

A legislação brasileira não define alimento funcional e sim a alegação de propriedade funcional e de propriedade de saúde e estabelece as diretrizes para sua utilização. Mensagens das alegações foram definidas e padronizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), condicionando-se o benefício alegado pelo consumo do alimento à adoção de uma dieta equilibrada e de hábitos de vida saudáveis (STRINGHETA; AQUINO; VILELA, 2010). Assim, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais e, ou, de saúde pode, além de suas funções básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde. Estes efeitos ocorrem em sua maioria quando o alimento é consumido como parte de uma dieta usual, sendo seguro seu consumo sem necessidade de supervisão médica (BRASIL, 1999; STRINGHETA et al., 2007; ROSA; COSTA, 2010).

Segundo Arvanitoyannis; Houwelingen-Koukaliaroglou (2005), o componente de um alimento que confere a este sua característica como funcional pode estar presente naturalmente no produto, como é o caso dos vegetais ricos em carotenóides, licopeno, flavonóides, etc., e podem ainda ser resultado da adição de tais componentes, benéficos a saúde, em uma matriz originalmente isenta ou com baixa quantidade dos mesmos. São muitos os fatores que vêm estimulando o desenvolvimento de alimentos funcionais ao longo dos últimos anos e, dentre eles, destacam-se principalmente o aumento da expectativa de vida em países desenvolvidos (cujas populações necessitarão de cuidados hospitalares por maior período de tempo), o elevado custo dos serviços de saúde, os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes, além da necessidade que as instituições públicas de pesquisa têm em divulgarem os resultados de suas investigações.

Os alimentos funcionais constituem prioridade de pesquisa em todo mundo com a finalidade de elucidar os efeitos que estes produtos podem apresentar na promoção da saúde (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Para Rosa; Costa (2010), a diversidade de compostos bioativos presentes nos

alimentos bem como sua ampla aplicação terapêutica, justificam a inesgotável busca por conhecimentos relativos às propriedades fisiológicas ou funcionais.

Segundo Oms-Oliu; Soliva-Fortuny (2011) existe um consenso entre pesquisadores de que o consumo de quantidades adequadas de frutas e hortaliças é a chave para uma dieta saudável uma vez que estes produtos contêm teores consideráveis de nutrientes funcionais como fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos que auxiliam na promoção da saúde do indivíduo, melhorando seu estado nutricional.

2.2. Produção de frutas no Brasil

O Brasil é conhecido internacionalmente como grande produtor de frutas por apresentar condições de clima e solo favoráveis (ABIR, 2009), ficando apenas atrás da China e da Índia no *ranking* de produtores (FAO, 2010), o que resulta em expressiva geração de empregos e renda e, conseqüentemente desenvolvimento do agronegócio.

A fruticultura vem sendo considerada um dos segmentos mais competitivos do setor agrícola brasileiro. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), indicaram que o Brasil produziu 40 bilhões de toneladas de frutas em 2010, um aumento de 2,41 % comparado à 2009, o que demonstra o potencial produtivo do país.

Mesmo com a elevada produtividade, o volume de perdas pós-colheita é considerável. Dessa forma, como alternativa a redução de desperdícios, agregação de valor aos produtos e em atendimento a um novo perfil de consumidor que tem exigido cada vez mais qualidade, praticidade e segurança, foi desenvolvida a tecnologia de processamento mínimo de frutas e hortaliças (VIANA; SABIO, 2008).

2.3. Frutas e hortaliças minimamente processadas

Os produtos minimamente processados são basicamente partes de frutas e hortaliças que passaram pelas etapas de lavagem, sanitização, corte e/ou fatiamento, embalagem e armazenamento sob refrigeração (MORETTI,

2007), porém são mantidos frescos e com qualidade para consumo, e estão associados a realidade da indústria de alimentos que busca tecnologias de processamento que minimizem alterações sensoriais e nutricionais do produto.

Estes alimentos apresentam qualidade semelhante à do produto fresco, uma vez que contêm tecidos vivos, são naturais e práticos, o que atende, conseqüentemente às exigências da vida moderna (HERNANDES et al., 2007). Assim, podem ser denominados também de levemente processados, parcialmente processados, cortados frescos (*fresh-cut*) ou ainda pré-preparados (MORETTI, 2007).

O mercado de frutas minimamente processadas ou prontas para consumo tem expandido mundialmente (MARTÍN-BELLOSO; SOLIVA-FORTUNY, 2011) como conseqüência do aumento da demanda dos consumidores por produtos saudáveis e que ofereçam praticidade. No Brasil, o mercado desses produtos embora seja incipiente e restrito aos grandes centros urbanos, aponta para um futuro promissor, uma vez que tem crescido consideravelmente, em virtude da melhoria da qualidade dos produtos ofertados, da necessidade de hábitos de vida mais saudáveis para redução do estresse e manutenção da aparência jovem, do maior número de mulheres que trabalham fora de casa, o que diminui seu tempo para a compra e preparo de alimentos, do maior número de pessoas que moram sozinhas, do aumento da renda e da maior facilidade para adquirir produtos já prontos para o consumo (CARNELOSSI, 2011).

Rojas-Graü; Garner; Martín-Belloso (2011), observaram que embora a produção e comercialização de frutas minimamente processadas tenha crescido rapidamente nos últimos anos, hortaliças minimamente processadas, sobretudo na forma de saladas, dominam o setor produtivo. Essa realidade tem levado a indústria de processamento mínimo a aumentar seu investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos.

Muitas frutas, já cultivadas no Brasil apresentam características desejáveis ao processamento mínimo, como maçã, banana, melancia, melão, abacaxi, mamão, goiaba, manga, carambola e jaca, e são bem aceitas por consumidores que buscam alimentos naturais (MORETTI, 2007).

A elaboração de saladas de frutas é uma alternativa viável para a cadeia de processamento mínimo, considerando a praticidade oferecida ao consumidor que adquire uma diversidade de frutas prontas para o consumo. Rosado; Pires e Peres (2008), em um estudo sobre mercado de salada de frutas minimamente processadas, verificaram que, aproximadamente, 80 % dos entrevistados consomem salada de frutas caseira e apenas 20 % não possuem esse hábito. Os principais motivos pelos quais 20 % dos entrevistados não consomem esse tipo de produto são por não gostarem desse tipo de alimento (38,5 %) e por não estarem dispostos a prepará-lo (61,5 %). Esses autores verificaram ainda que, em geral, os consumidores de salada de frutas caseira utilizam, no seu preparo, frutas como banana (87,2 %), laranja (86,2 %), maçã (63,5 %), mamão (56,1 %), abacaxi (41,4 %), uva (28,1 %), manga (22,2 %), goiaba (19,2 %), morango (18,7 %), pêsego (17,2 %), tangerina (8,4 %), maracujá (7,4 %) e kiwi (5,9 %).

O maior problema do segmento do processamento mínimo é a curta vida útil dos vários tipos de produto. O processo de deterioração microbiológica libera compostos aromáticos característicos, que são facilmente detectáveis, além de promoverem um efeito visual negativo no alimento (MORETTI, 2007). A oxidação também é um grave problema que acomete os produtos minimamente processados. De acordo com Oliveira M. et al. (2011) e Chitarra; Chitarra (2005), a etapa de descascamento promove a liberação de exudado celular contendo enzimas que causam escurecimento da superfície das frutas prejudicando sua aparência.

Considerando esses problemas existe uma busca constante por tecnologias que auxiliem no aumento da vida de prateleira das frutas minimamente processadas, como uso de antioxidantes (MELO; VILAS BOAS, 2006), irradiação, atmosfera modificada, películas comestíveis (FONTES et al., 2008), utilização de bactérias lácticas probióticas e produtoras de bacteriocinas (SETTANNI; CORSETTI, 2008); além do uso de bactérias probióticas atuando na biopreservação em serviços de alimentação (RODGERS, 2008). Outros estudos visam alterar as características estruturais das frutas, por modificação dos componentes deste produto por meio da impregnação a vácuo de culturas probióticas (BETORET et al.,

2012) promotoras de saúde e de outros compostos bioativos, impregnação a pressão atmosférica, além de imobilização dessas culturas em frutas.

2.4. Probióticos

Diversas definições de probióticos já foram publicadas, no entanto, a aceita internacionalmente, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde, é que eles são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; Sanders, 2003). Ferreira; Silva (2010) acreditam que esta definição não deverá permanecer por muito tempo, uma vez que vários micro-organismos, como os componentes de fermentos lácticos, por exemplo, promovem benefícios ao hospedeiro e não são considerados probióticos.

De acordo com Komatsu; Buriti; Saad (2008) existe alguns critérios para que um micro-organismo seja classificado como probiótico para uso humano, como ser de origem humana; não apresentar patogenicidade; resistir aos processos tecnológicos; possuir adesão aos tecidos epiteliais; persistir no ambiente gastrointestinal; ser estável na presença de ácido e bile; entre outros.

As bactérias lácticas, particularmente os lactobacilos (predominantes no intestino delgado) e as bifidobactérias (predominantes no intestino grosso) (FERREIRA; SILVA, 2010), são conhecidos por resistir à acidez do estômago, aos sais biliares e enzimas pancreáticas, além de aderir à mucosa e colonizar o trato intestinal (FIORAMONTI; THEODOROU; BUENO, 2003; SOCCOL et al., 2010), sendo consideradas as principais representantes dos probióticos em alimentos, os quais são amplamente empregados como ingredientes funcionais (RODGERS, 2008; SAAD et al., 2011).

As bactérias lácticas são cocos ou bastonetes Gram-positivos que não apresentam motilidade ou apresentam em raras ocasiões, são fermentadoras de açúcar produzindo ácido lático ou ácido lático, ácido acético, etanol e CO₂. São encontradas em diferentes nichos ecológicos como em produtos de laticínios, vegetais, carnes (principalmente

Lactobacillus e *Pediococcus*), mucosa humana ou animal (basicamente *Streptococcus*) e no trato digestivo (*Streptococcus* e *Lactobacillus*). Além disso, podem apresentar-se como anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerofílicos e são considerados micro-organismos fastidiosos e basicamente sacarolíticos (FERREIRA, 2008).

As principais bactérias probióticas utilizadas em alimentos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (FERREIRA; SILVA, 2010). Além destes, outros como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Propionibacterium freudenreichii* tem sido frequentemente estudados (MORAIS; JACOB, 2006). Destes micro-organismos aqueles pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais amplamente empregados e comercializados em todo o mundo (SAULNIER et al., 2009; SAAD et al, 2011; CHAMPAGNE et al., 2011), por serem isolados de todas as porções do trato gastrointestinal de humanos saudáveis. O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002).

De acordo com Soccol et al. (2010), o potencial probiótico de diferentes estirpes bacterianas pode diferir apesar delas pertencerem à mesma espécie. Assim, diferentes estirpes da mesma espécie são sempre únicas e podem ter diferentes áreas de aderência, com sítios específicos, promovendo efeitos imunológicos diferenciados e, conseqüentemente, ações sobre a saúde.

2.4.1. Principais gêneros de bactérias probióticas: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

Lactobacillus é o principal gênero dentro do grupo das bactérias lácticas (ANGELIS; GOBETTI, 2011). São considerados micro-organismos de grande importância para a indústria de alimentos sendo usados em muitas fermentações e, embora seu uso nas indústrias de laticínios seja de

particular importância econômica, eles também são essenciais na produção de alimentos não lácteos, como salame e conservas vegetais (FERREIRA, 2003).

As características fenotípicas mais utilizadas na identificação de *Lactobacillus* são: forma, coloração de Gram, arranjo, motilidade, catalase, temperatura máxima e mínima de crescimento e fermentação de diferentes tipos carboidratos (BOTELHO, 2005).

De acordo com Burity; Saad (2007), no *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology*, o gênero *Lactobacillus* é descrito como um grupo heterogêneo de bastonetes regulares, Gram-positivos e não esporulados. Possuem morfologia celular variando de bastonetes longos e finos até, algumas vezes, como bastonetes curvados e pequenos, podendo apresentar-se na forma de cocobacilos isolados, aos pares ou formando correntes curtas. Não são formadores de esporos e são catalase negativos (FERREIRA, 2003). Gomes; Malcata (2002) reportaram que este gênero compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas.

Os lactobacilos são anaeróbios facultativos ou microaerófilos e, quando cultivados em meios sólidos, geralmente o desenvolvimento é melhor em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzida. Nos meios usuais de crescimento, eles raramente produzem pigmentos que, quando presentes, são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo (FERREIRA, 2003). Além disso, apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35 °C a 40 °C, são acidúricos, com pH ótimo entre 4,5 e 6,4 e taxa de crescimento frequentemente reduzida quando o pH atinge 3,6 a 4,0 (SHAH, 2007).

Algumas bactérias lácticas fermentam a glicose predominantemente a ácido láctico quando realizam a homofermentação, como é o caso de *L. acidophilus*; ou em ácido láctico, CO₂ e etanol e/ou ácido acético no caso da heterofermentação, realizada por *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, por exemplo (FERREIRA, 2003; SOCCOL et al., 2010).

O segundo gênero de maior importância entre os micro-organismos probióticos é o *Bifidobacterium*, que é caracterizado por bactérias Gram-positivas que apresentam pleomorfismo nas formas V, Y, palissadas e numa variedade de formas cocóides e alongadas (SOCCOL et al., 2010). São

anaeróbios, não formadores de esporos, não móveis, catalase negativa e são sensíveis a ambientes ácidos com pH abaixo de 5,0. Além disso, metabolizam a glicose com formação de acetato e lactato, sem formação de CO₂. Mais de 35 espécies são incluídas no gênero *Bifidobacterium*, sendo as espécies *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve* e *B. adolescentis* utilizadas principalmente como probióticos em alimentos. Bactérias bífidas em níveis elevados estão relacionadas à microbiota intestinal saudável em todas as fases da vida (FERREIRA, 2003), principalmente nos recém nascidos (SOCCOL et al., 2010).

Segundo Ferreira; Silva (2010), as bifidobactérias não são práticas de serem empregadas como probióticos em alimentos, uma vez que são difíceis de serem isoladas e manipuladas por exigirem condições de anaerobiose e serem intolerantes a ambientes ácidos, o que torna inviável sua utilização em produtos lácteos fermentados, carreadores de bactérias probióticas. Assim, a melhor estratégia para o aumento do número desse grupo microbiano no cólon é o consumo de prebióticos ou de alimentos simbióticos, que, além de um micro-organismo probiótico, fornecem um ingrediente prebiótico que estimulará as estirpes de bactérias bífidas já existentes no cólon.

2.4.2. Benefícios do consumo de bactérias probióticas para a saúde humana

O número de estudos e publicações sobre os probióticos aumentou nos últimos anos em função do interesse dos pesquisadores estimulados pelos benefícios promovidos por estes micro-organismos, atribuídos a saúde, além da demanda dos consumidores por produtos naturais (WINTER, 2008; SAAD et al., 2011).

Muitos são os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas tais como controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos (SOCCOL et al., 2010); promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos (ZHANG et al., 2011); competição por nutrientes; competição por sítios de adesão; promoção da digestão da lactose em indivíduos

intolerantes à esse carboidrato; estimulação do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de certos nutrientes, como proteínas, minerais e ácidos graxos de cadeia curta (FERREIRA; SILVA, 2010; SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011).

De acordo com Singh et al. (2011), o problema de intolerância à lactose afeta, aproximadamente, 70 % da população mundial. Algumas estirpes de bactérias lácticas, como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e outras do gênero *Lactobacillus* presentes em produtos lácteos fermentados podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse dissacarídeo reduzindo a constipação e a diarreia infantil, uma vez que quando estas bactérias são lisadas por secreções biliares, a lactase liberada no lúmen intestinal age sobre a lactose ingerida, aliviando sintomas de má digestão que pode haver em decorrência da presença desse carboidrato. Assim, o consumo desses produtos pode ser uma boa forma de incorporar produtos lácteos e seus nutrientes à dieta de indivíduos com intolerância à lactose (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Além disso, os produtos lácteos fermentados apresentam redução do teor de lactose em decorrência da clivagem deste dissacarídeo pela ação da enzima lactase produzida pelas bactérias lácticas.

Outros efeitos atribuídos às culturas probióticas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. Sugere-se também, a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol e efeitos anti-hipertensivos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; SINGH et al., 2011).

As doenças infecciosas ainda são o maior problema de saúde pública a ser resolvido no mundo. Infecções intestinais causadas pela ingestão de micro-organismos patogênicos presentes em água contaminada e alimentos são as maiores causas de morte. Diante dessas circunstâncias, o consumo de probióticos pode auxiliar o problema de infecções alimentares, como vem sendo relatado em alguns estudos (SOCCOL et al., 2010; SINGH et al., 2011), uma vez que estes micro-organismos competem com bactérias patogênicas por sítios de adesão, evitando a colonização por estirpes de *E. coli* e *Salmonella* sp. (SHERMAN et al., 2005; LIN et al., 2008), além de *Shigella* (SINGH et al., 2011).

Segundo Komatsu; Buriti; Saad (2008), quando se deseja garantir um efeito contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente, entretanto, não existe na literatura um consenso sobre a quantidade mínima de micro-organismos probióticos a ser ingerida para garantir sua funcionalidade. Enquanto alguns pesquisadores recomendam que o produto deve conter no mínimo 10^6 a 10^7 UFC/g de micro-organismos probióticos (DAVE; SHAH, 1997a; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000), outros sugerem maiores concentrações. Segundo Prado et al. (2008), quando se deseja garantir um efeito benéfico contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente em altos números, geralmente mais de 10^9 células por dose. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal, capazes de garantir a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC/g) *in vivo*, foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de micro-organismos probióticos (10^6 a 10^7 UFC/g de bioproduto) (SHAH, 2000). Para Shah (2007), a ingestão diária deve ser de aproximadamente 10^8 UFC/g com o objetivo de compensar a possível redução do número destes micro-organismos durante a passagem pelo intestino.

A recomendação brasileira mais recente para alimentos probióticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos funcionais, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC/dia (BRASIL, 2008).

Como o objetivo do consumo de produtos probióticos é resultar em uma microbiota intestinal balanceada, a qual, por sua vez, terá um impacto favorável sobre a saúde do consumidor, uma seleção adequada de estirpes deve ser conduzida para o processamento de produtos alimentícios probióticos (FERREIRA; SILVA, 2010). Essa seleção visa garantir a sobrevivência desses micro-organismos à passagem pelo trato gastrointestinal após a manutenção de sua viabilidade no próprio produto-alvo, durante sua elaboração e armazenamento, bem como conferir propriedades tecnológicas adequadas a esse produto (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

2.4.3. Prebióticos

Os prebióticos são definidos como ingredientes fermentáveis, entretanto não digeríveis, cujos efeitos beneficiam o hospedeiro por estimular o crescimento e/ou ativação do metabolismo de muitos grupos de bactérias benéficas no trato intestinal, atuando na associação com probióticos (RENHE et al., 2008; FERREIRA; SILVA, 2010).

Adicionalmente, os prebióticos podem inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro, por agirem estimulando o crescimento dos grupos endógenos de população microbiana, como as bifidobactérias e os lactobacilos (ROBERFROID, 2007; CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012). Assim, o consumo de prebióticos tem sido relacionado com a redução do risco de determinadas enfermidades (SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011).

De acordo com Reig e Anesto (2002), para que uma substância ou grupo de substâncias possa ser definido como prebiótico, estas devem ser de origem vegetal, fazer parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas, não ser digerida pelas enzimas digestivas, ser parcialmente fermentada pelas bactérias colônicas e ser osmoticamente ativa.

Os prebióticos, segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO, 2008), são identificados como carboidratos não-digeríveis, incluindo inulina, oligofrutose, galactooligossacarídeos, lactulose, oligossacarídeos do leite humano e diversos oligossacarídeos que fornecem carboidratos que as bactérias benéficas do cólon são capazes de fermentar (SAAD, 2006; FORSTEN; SINDELAR; OUWEHAND, 2011). As principais fontes de prebióticos são alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, peptídeos, proteínas, alcoóis de açúcares e os oligossacarídeos (RENHE et al., 2008), sendo que desses últimos, de acordo com Ferreira; Silva (2010), os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina são os mais utilizados.

Oligossacarídeos prebióticos são encontrados em algumas frutas presentes na salada elaborada no presente estudo. Segundo Pimentel; Francki; Goellicke (2005), vários tipos de oligossacarídeos são encontrados como componentes naturais de frutas como banana e vegetais (alcachofra,

aspargo, raiz de chicória, cebola), entre outros, sendo que muitos destes apresentam propriedades bifidogênicas.

Muitos prebióticos são utilizados como ingredientes de alimentos, como pães, biscoitos, sucos e produtos lácteos, além de fórmulas infantis, sendo muito comercializados na forma de pó. Segundo Millani; Konstantyner; Taddei (2009), a suplementação de prebióticos em fórmulas infantis ou de forma isolada tem aumentado significativamente nos últimos anos, impulsionando a indústria alimentícia a destacar esses nutrientes nos rótulos dos alimentos e difundir recomendações junto aos profissionais de saúde para utilização rotineira de seus produtos.

Ao ser incorporado em alimentos, os prebióticos devem ser estáveis às condições de processamento e não devem alterar as características sensoriais do produto (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012). Doses diárias de 5 a 20 g de inulina e/ou oligofrutose, administradas durante pelo menos 15 dias, são eficientes para garantir benefícios, como o estímulo da multiplicação de bifidobactérias no cólon (SAAD, 2006). Segundo Brasil (2008), a recomendação diária mínima de FOS e inulina é de 3 g para alimentos sólidos e 1,5 g para alimentos líquidos.

Além do consumo de prebióticos para garantir a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, dietas contendo alimentos probióticos são essenciais.

2.5. Aplicação industrial de bactérias probióticas em produtos de origem vegetal

Produtos contendo bactérias probióticas ocupam grande espaço entre os alimentos funcionais, sendo utilizados não só em produtos lácteos como iogurtes, queijos, sorvetes, manteiga (SOCCOL et al., 2010), sobremesas, flans (ESPÍRITO-SANTO et al., 2011), mas também em produtos não lácteos à base de cereais, fórmulas para alimentação infantil, produtos derivados de soja (SINGH et al., 2011), produtos a base de frutas e hortaliças como bebidas, purês, hortaliças fermentadas, azeitonas de mesa (PERES et al., 2012), produtos minimamente processados (RÖßLE et al., 2010a,b; MARTINS et al., 2011a,b; OLIVEIRA, P. et al., 2011), entre outros,

que apresentam mercado em contínua expansão mundial, em virtude de sua demanda voltada aos benefícios potenciais à saúde (CHAMPAGNE et al., 2011).

O mercado global de ingredientes probióticos e de suplementos em 2008 gerou US\$ 16 bilhões. Estimativas apontam um total de vendas para 2013 de US\$ 19,6 bilhões, com uma taxa de crescimento anual de 4,3% (FOOD PROCESSING, 2009).

A maioria dos produtos probióticos disponíveis no mercado são de base láctea, havendo um crescente interesse na elaboração de produtos probióticos não lácteos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). De acordo com Schmidt; Pereira (2011), o apelo ao consumo de probióticos esbarra, atualmente, no vegetarianismo crescente, além do número elevado de indivíduos com intolerância à lactose e que possuem restrição de colesterol na dieta. Razões econômicas e culturais também podem influir negativamente no consumo de produtos lácteos probióticos, uma vez que são na maioria alimentos fermentados. Assim, o desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos incluindo outras matrizes a base de frutas, hortaliças e cereais (Tabela 1) aponta para um futuro promissor (PERES et al., 2012).

2.5.1. Sucos

Alguns estudos tratam da utilização de bactérias probióticas em sucos de frutas e hortaliças fermentados a fim de fornecer ao consumidor alimentos probióticos isentos de colesterol, lactose e substâncias alergênicas presentes nos produtos lácteos. Yoon; Woodams; Hang (2004) elaboraram suco de tomate e Yoon; Woodams; Hang (2005) suco de beterraba fermentado por *L. acidophilus* LA39, *L. casei* A4, *Lactobacillus delbrueckii* D7 e *L. plantarum* C3 e constataram que os micro-organismos foram capazes de utilizar o suco de tomate e beterraba para síntese celular e produção de ácido láctico, obtendo contagens acima de 10^6 UFC/mL após 4 semanas de armazenamento a 4 °C. No entanto, *L. acidophilus* perdeu parcialmente sua viabilidade após a segunda semana de armazenamento, apresentando contagens inferiores as demais bactérias utilizadas.

Tabela 1 – Estudos recentes sobre a utilização de matrizes vegetais para veiculação de bactérias probióticas

| Matriz suporte | Micro-organismo probiótico utilizado | Produto alimentício | Referência |
|---|--|------------------------|---------------------------------------|
| Maçã | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | Minimamente processado | Röbke et al. (2010a,b) |
| Cacau | <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus helveticus</i> | Chocolate | Possemiers et al. (2010) |
| Cajú | <i>Lactobacillus johnsonii</i> | Suco | Vergara et al. (2010) |
| Laranja, uva, groselha preta, abacaxi, romã, <i>cramberry</i> e limão | <i>Lactobacillus plantarum</i> | Suco | Nuallkaekul & Charalampopoulos (2011) |
| Melão | <i>Lactobacillus casei</i> | Suco | Fonteles et al. (2011) |
| Cajú | <i>L. casei</i> | Suco | Pereira; Maciel; Rodrigues (2011) |
| Maçã | <i>L. rhamnosus</i> GG | Minimamente processado | Alegre et al. (2011) |
| Inhame | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Inhame fermentado | Lee et al. (2011a) |
| Shalgam (cenoura preta, nabo) | <i>L. plantarum</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i> | Bebida | Tanguler & Erten (2012) |
| Pêra | <i>L. acidophilus</i> | Suco | Ankolekar et al. (2012) |
| Ameixa | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Candida kefir</i> e <i>Saccharomyces boluradii</i> | Suco | Sheela & Suganya (2012) |
| Azeitona | <i>L. plantarum</i> | Azeitonas de mesa | Hurtado et al. (2012) |
| Maçã, suco de maçã, de mandarina e de abacaxi com uva | <i>Lactobacillus salivarius</i> e <i>L. acidophilus</i> | Snack | Betoret et al. (2012) |
| Maçã | <i>L. casei</i> | Bebida | Ellendersen et al. (2012) |
| Malte, cevada | <i>L. plantarum</i> e <i>L. acidophilus</i> | Bebida | Rathore; Salmerón; Pandiella (2012) |
| Soja | <i>L. acidophilus</i> | Barra de soja | Chen & Mustapha (2012) |
| Cevada, polpa de tomate e soro em pó | <i>L. acidophilus</i> | Mistura alimentícia | Jood et al. (2012) |
| Repolho | <i>L. plantarum</i> | Chucrute | Yu et al. (2012) |

Suco de repolho probiótico foi produzido por Yoon et al. (2006) utilizando *L. casei* A4, *L. delbrueckii* D7 e *L. plantarum* C3. Os pesquisadores verificaram que as culturas cresceram bem no suco, atingindo contagens de 10^9 UFC/mL após 48h de fermentação a 30 °C. Após 4 semanas de armazenamento a 4 °C, a contagem de *L. plantarum* era da ordem de 10^7 UFC/mL e de *L. delbrueckii* da ordem de 10^5 UFC/mL. Entretanto, os autores observaram que *L. casei* não sobreviveu às condições de pH e acidez do suco, com consequente perda de sua viabilidade após 2 semanas a 4 °C.

De acordo com Komatsu; Buriti; Saad (2008), algumas estirpes de bactérias probióticas não conseguem sobreviver em produtos fermentados e, por isso, deve-se considerar a escolha da estirpe mais adequada para cada tipo de produto.

Sheehan; Ross; Fitzgerald (2007) estudaram a sobrevivência de *L. casei* DN 114001, *L. rhamnosus* GG e *L. paracasei* NFBC 43338 além de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 em suco de laranja, abacaxi e *cranberry* e constataram que as estirpes sobreviveram mais nos sucos de laranja e abacaxi comparado ao suco de *cranberry*. *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* apresentaram contagens acima de 10^7 UFC/mL em suco de laranja e acima de 10^6 UFC/mL em suco de abacaxi por 12 semanas de armazenamento a 4 °C, além de apresentarem-se pouco sensíveis ao baixo pH do produto. Já *B. lactis* apresentou contagens acima de 10^6 UFC/mL em ambos os sucos somente até a quarta semana de armazenamento, devido possivelmente à exposição ao oxigênio e às condições ácidas durante a estocagem sob refrigeração. Os autores sugeriram que os sucos obtidos podem ser destinados a consumidores de todas as idades sendo considerado uma bebida refrescante e saudável.

Champagne; Gardner (2008) avaliaram a viabilidade de nove estirpes do gênero *Lactobacillus* (*L. acidophilus* LB2, LB3 e LB45, *L. brevis* LB6, *L. rhamnosus* LB11 e LB24, *L. fermentum* LB32, *L. plantarum* LB42 e *L. reuteri* LB38) em uma bebida comercial de fruta estocada a 4 °C por até 80 dias. *L. brevis* LB6, *L. rhamnosus* LB24 e *L. acidophilus* LB45 tiveram padrão de viabilidade similar à *L. fermentum* LB32, *L. reuteri*, LB38 e *L. plantarum* LB42, respectivamente. Ambas as estirpes de *L. rhamnosus* apresentaram

bom padrão de viabilidade, sendo que as estirpes de *L. rhamnosus* LB11, *L. plantarum* LB42 e *L. reuteri* LB38 apresentaram contagens acima de 10^7 UFC/mL ao longo dos 80 dias de armazenamento. Os autores observaram que a estabilidade dos micro-organismos frente à bebida é variável de acordo com a espécie e estirpe empregadas.

Suco misto de cenoura, aipo e maçã representou uma matriz alternativa para produção de bebida probiótica contendo *L. acidophilus* LA-5 (NICOLESCO; BURULEANU, 2010). Esta estirpe apresentou boa capacidade de crescimento na bebida, sem suplementação de nutrientes, uma vez que os autores verificaram por meio da redução da biodisponibilidade de açúcares do suco que este foi utilizado como substrato para a atividade metabólica da cultura probiótica, que apresentou contagens acima de 10^7 UFC/mL.

Estudo conduzido por Nualkaekul; Charalampopoulos (2011) avaliou a sobrevivência de *L. plantarum* NCIMB 8826 em sucos de laranja, uva, groselha preta, abacaxi, romã, *cramberry* e limão, durante a estocagem a 4 °C por 6 semanas, partindo de um inóculo contendo, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL da cultura. Segundo os pesquisadores, a viabilidade celular foi mantida exceto nos sucos de *cramberry* e romã, que apresentaram redução rápida da viabilidade na primeira e terceira semanas, respectivamente. Nos demais sucos, as contagens de *L. plantarum* foram acima de 10^7 UFC/mL até o final da vida de prateleira. Para Nualkaekul; Charalampopoulos (2011), alguns sucos possuem alguns compostos que parecem proteger a cultura durante a estocagem, como proteínas e fibras. Em contraste, no suco de romã a viabilidade foi menor que a esperada devido, possivelmente, a presença de compostos antimicrobianos, tais como os compostos fenólicos.

No entanto, Mousavi et al. (2011) observaram em seu estudo que *L. plantarum* e *L. delbrueckii* fermentaram suco de romã, havendo ótimo crescimento e mantiveram a viabilidade nas duas primeiras semanas de estocagem a 4 °C, ao passo que *L. acidophilus* e *L. paracasei* perderam a viabilidade. Os autores verificaram que o ácido cítrico, principal ácido orgânico presente no suco de romã, foi rapidamente consumido por todas as culturas probióticas, o que demonstrou que o suco pode ser um substrato potencial para produção de bebida probiótica.

Suco de melão cataloupe adicionado de *L. casei* NRRL B-442 foi objeto de estudo de Fonteles et al. (2011). Os autores buscaram otimizar o pH, a temperatura e o tempo de fermentação para produção da bebida fermentada e constataram que as condições ótimas para o crescimento de *L. casei* foi pH de 6,1 e armazenamento a 31 °C por oito horas. Nestas condições a viabilidade da cultura foi de 8,3 Log UFC/mL, a qual foi mantida durante 42 dias de estocagem sob refrigeração, o que sugere que o melão cataloupe é um veículo adequado para *L. casei*, constituindo mais uma alternativa aos produtos lácteos tradicionais.

Saw et al. (2011) exploraram o uso de suco de frutas tropicais (melancia, melão *honeydew*, melão cataloupe, pêra chinesa e pitaia) como substrato para fermentação de *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* NCIMB 4114 e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCIMB 11778 e verificaram que a melancia e ambas as variedades de melão foram substratos ideais, principalmente para *L. casei*. Neste estudo selecionou-se o suco de melão *honeydew* para elaborar uma bebida fermentada, a qual apresentou contagens de, aproximadamente, 10⁹ UFC/mL após 48 horas de fermentação 37 °C, com redução do pH do produto de 6,3 para 3,2. Segundo os autores, *L. casei* pareceu ser relativamente tolerante ao ácido uma vez que a contagem foi mantida durante as 48 horas de fermentação.

A sobrevivência de *L. casei* NRRLB 442 foi investigada também por Pereira; Maciel; Rodrigues (2011) em suco de caju durante 42 dias de armazenamento a 4 °C. Condições ótimas para produção do suco probiótico foram pH inicial de 6,4, com temperatura de fermentação de 30 °C por 16 horas, partindo de um inóculo contendo 7,48 Log UFC/mL. Contagens de *L. casei* acima de 8,0 Log UFC/mL foram constatadas durante o período de armazenamento do produto.

Betoret et al. (2012) desenvolveram *snack* a partir de maçã, suco de mandarina e suco de abacaxi com uva com alto conteúdo de *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius* CETC4063 e *L. Acidophilus* CECT903 por meio de impregnação à vácuo e secagem. O produto foi utilizado com potencial efeito contra a infecção causada por *Helicobacter pylori*. Embora o processo de secagem tenha afetado a viabilidade de *L. Salivarius*, o produto apresentou contagem acima de 7,0 Log UFC/g de matéria seca. Adicionalmente, após

realização de testes preliminares *in vivo* administrando o produto em cinco crianças infectadas cronicamente por *H. Pylori* durante 28 dias, os resultados sugeriram o possível efeito desse novo produto sobre os sintomas da infecção.

2.5.2. Produtos minimamente processados

Alimentos probióticos contendo frutas como ingrediente têm sido considerados cada vez mais prediletos pelos consumidores (ESPÍRITO-SANTO et al., 2011). Preparados de frutas minimamente processadas são alimentos populares e saudáveis, e segundo Martins et al. (2011a,b), vêm sendo considerados um veículo ideal para incorporação de outros componentes funcionais, como as culturas probióticas. Estes autores avaliaram a viabilidade das culturas probióticas de *L. acidophilus* LA-5 e *L. rhamnosus* HN001 e concluíram que após 5 dias de estocagem a 8 °C, o produto continha acima de 10^8 UFC/g das culturas.

Poucos estudos tratam da adição de culturas probióticas em frutas minimamente processadas, sendo também escassos na literatura estudos que contemplem a adição de probióticos em filmes e coberturas comestíveis para incorporação nestes alimentos.

Tapia et al. (2007) desenvolveram as primeiras coberturas comestíveis a base de alginato e goma gelana, contendo bifidobactérias probióticas para uso em maçã e mamão minimamente processados e observaram que ambas as frutas foram revestidas com sucesso, sendo a viabilidade de *B. lactis* BB-12 acima 10^6 UFC/g durante 10 dias de armazenamento refrigerado. Para Rojas-Graü; Soliva-Fortuny; Martín-Belloso (2009), este trabalho representou um avanço promissor na busca de novas aplicações de filmes e coberturas comestíveis como veículos de aditivos alimentares, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de produtos probióticos.

Soares et al. (2011) estudaram a aplicação de revestimento comestível a base de amido de milho e fécula de batata contendo a cultura probiótica *L. casei* em melão minimamente processado. Os autores concluíram que a utilização do revestimento comestível probiótico em frutas

minimamente processadas é viável uma vez que a cultura probiótica apresentou contagens de 7,5 Log UFC/g durante 6 dias de estocagem à 7 °C, e não alterou o pH e o teor de sólidos solúveis do produto.

De acordo com Espírito-Santo et al. (2011) alguns estudos apontam para a aplicabilidade da maçã como um ingrediente para aumentar a viabilidade de culturas probióticas em alimentos. Pedacões de maçã e pêra foram utilizados com sucesso na imobilização de *L. Casei*, uma vez que as bactérias probióticas se ligaram na estrutura celulósica destas frutas. Segundo Kourkoutas; Kanellaki; Koutinas (2006), pedacões de maçã são potenciais veículos de bactérias probióticas e podem ser utilizados na produção de leite fermentado probiótico e/ou outros produtos, prolongando sua vida de prateleira.

2.5.3. Hortaliças cruas e fermentadas

Além das frutas, hortaliças cruas e fermentadas vêm sendo utilizadas como substrato para as bactérias probióticas. Estudo realizado por Rodgers (2007) que destacou a utilização de probióticos em alimentos destinados a refeições, mostrou que culturas liofilizadas de *L. acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 apresentaram alta viabilidade celular no inóculo que continha de 10^{11} a 10^{15} UFC/g, resultando em doses terapêuticas de 10^7 UFC/g em sanduíches após 4 dias de estocagem.

Segundo Rodgers (2008), estabelecimentos “food service” podem competir com laticínios na distribuição de micro-organismos probióticos. Como o alimento é um carreador de probióticos, este pode também ser dissolvido em pílulas e preparações líquidas como nutracêuticos, além de preparações liofilizadas (FERREIRA; SILVA, 2010).

Lima et al. (2009) a fim de produzir cenoura minimamente processada probiótica para consumo na forma de salada, verificaram contagens de *L. acidophilus* NCFM da ordem de 10^6 UFC/g no produto armazenado a 5 °C e 7 °C por até 96 horas.

A viabilidade de *L. paracasei* foi avaliada em alface minimamente processada por Cruz et al. (2010), que constataram que a cultura se manteve viável durante 96 horas em temperaturas de 5 °C e 10 °C, estando

a contagem na ordem de 10^7 UFC/g.

O yacon, uma raiz tuberosa de sabor levemente adocicado, foi minimamente processado e enriquecido com *L. acidophilus* NCFM por Chaves et al. (2011). Os autores verificaram contagens acima de 10^8 UFC/g por até 96 horas de armazenamento do produto a 5 °C e 10 °C, o que demonstra que o yacon é considerado um ótimo substrato para o crescimento de *L. acidophilus* NCFM, sendo o produto final considerado potencialmente simbiótico.

Silva et al. (2011) e Fernandes et al. (2011) avaliaram a viabilidade de *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* HN001, respectivamente, em couve minimamente processada bem como as características físico-químicas do produto. De acordo com os resultados, as culturas probióticas mantiveram-se viáveis no produto com contagens acima de 10^7 UFC/g por até 96 horas de armazenamento a 8 °C e não promoveram alterações no pH, acidez e cor da couve minimamente processada.

Produtos fermentados de plantas também vêm sendo considerados um vetor para incorporação de bactérias probióticas uma vez que contêm nutrientes (SOCCOL et al., 2010) que servem como substrato para estes micro-organismos e vêm ao encontro da dieta vegetariana. Muitos tipos de vegetais fermentados são consumidos no mundo, tais como pepino, repolho, picles de hortaliças e *Kimchi* (ÇETIN, 2011).

Çetin (2011) avaliou o comportamento de *L. plantarum* em Turş u, um produto fermentado consumido na Turquia, a base de repolho, pepino, tomate verde, pimentão verde, cenoura, pimentão vermelho, alho e salsa durante 60 dias de armazenamento. O autor verificou que o produto apresentou pH de 3,62 e viabilidade de *L. plantarum* igual a 7,49 Log UFC/mL, no final da estocagem. Além disso, segundo o autor, a adição de *L. plantarum* em Turş u realçou o sabor do produto.

Kimchi é outro exemplo de produto fermentado de origem vegetal consumido por coreanos que vem ganhando popularidade como alimento funcional (LEE et al., 2011b), por apresentar alto conteúdo de vitaminas, minerais, fibras e compostos fitoquímicos. Como é um produto consumido cru, *Kimchi* tem sido considerado como potencial carreador de bactérias lácticas probióticas.

Estudo realizado por De-Bellis et al. (2010), avaliou populações microbianas associadas com a superfície de azeitonas inoculadas com *L. Paracasei* IMPC2.1 em salmoras contendo diferentes concentrações de NaCl (4 e 8 %), a fim de verificar a persistência da estirpe probiótica durante todo o processo. Os resultados mostraram que *L. Paracasei* colonizou a superfície das azeitonas e dominou a população de bactérias lácticas nativa do produto, com redução do pH para <5,0 após 30 dias e contagens da ordem de 10^7 UFC/g.

De acordo com Peres et al. (2012), culturas probióticas do gênero *Lactobacillus* vem sendo testadas recentemente na fermentação de azeitonas de mesa. Estudos mostram que algumas estirpes toleram relativamente a acidez e a salinidade dos vegetais fermentados e, assim, podem se ligar efetivamente na superfície de azeitonas, promovendo alterações sensoriais desejáveis, além de estender a vida útil do produto.

2.5.4. Cereais

Os cereais também têm sido avaliados pelo seu potencial uso em alimentos funcionais por conterem além de substâncias prebióticas nativas, que protegem os micro-organismos probióticos das condições adversas do trato gastrointestinal, nutrientes como proteínas, vitaminas e minerais (RIVERA-ESPINOSA; GALLARDO-NAVARRO, 2010), e dão origem a produtos diversos, como bebidas fermentadas, sopas, mingaus, entre outros (CLERICI; STEEL; CHANG, 2011).

A fermentação de cereais como aveia, milho e trigo por micro-organismos probióticos é benéfica, por promover uma melhor digestibilidade dos alimentos, devido à redução de carboidratos não digeríveis, como polissacarídeos e oligossacarídeos, disponibilidade de vitaminas do complexo B, bem como a liberação de minerais tais como cálcio, zinco, ferro, entre outros (SOCCOL et al., 2010).

Charalampopoulos; Pandiella (2010) estudaram a sobrevivência de *L. plantarum* em extratos de malte, cevada e trigo produzidos em suspensão farinha/água. A fermentação foi conduzida por 24 horas a 37 °C e o produto foi estocado a 4 °C por 70 dias. Os pesquisadores observaram que a

bactéria sobreviveu melhor durante a estocagem refrigerada no meio contendo extrato de malte, constatação essa atribuída a maior concentração de açúcar e de outros compostos não identificados que podem ter protegido as células bacterianas.

Estudo realizado por Rathore; Salmerón; Pandiella (2012) avaliou malte, cevada e a mistura de malte e cevada na elaboração de bebida fermentada por *L. plantarum* NCIMB8826 e *L. acidophilus* NCIMB8821. O efeito dos cereais adicionados ao meio isoladamente e em mistura foi estudado durante a fermentação por 28 horas a 30 °C. Os autores verificaram que o crescimento das culturas foi mais elevado no meio contendo malte, onde a população celular de *L. plantarum* atingiu 8,59 Log UFC/mL e de *L. acidophilus* atingiu 8,69 Log UFC/mL, sendo o crescimento das culturas no meio contendo os cereais isolados similar ao da mistura.

Os cereais (arroz, cevada, aveia e trigo), farinha de soja e mosto de uvas vermelhas concentrado, foram usados na elaboração de bebida do tipo iogurte fermentado por duas estirpes de *L. Plantarum* 6E e M6 por Coda et al. (2012). Todas as formulações da bebida apresentaram contagens acima de 8,4 Log UFC/g até os 30 dias de estocagem a 4 °C, sendo que o produto contendo a mistura de arroz e cevada ou flocos de trigo, apresentou a melhor combinação das propriedades sensoriais, nutricionais e de textura.

A fermentação é conhecida por aumentar o valor nutricional e, ao mesmo tempo, melhorar a aceitabilidade dos produtos derivados de soja. O grão de soja é rico em proteínas de alta qualidade e, também, contém oligossacarídeos, como a rafinose e a estaquiose, que não são digeridos pelo organismo humano, podendo causar flatulência (SOCCOL et al., 2010). Assim, a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja por bactérias probióticas traz benefícios múltiplos, no sentido de reduzir os açúcares causadores de flatulência e conservar melhor o produto contribuindo, também, para a saúde do consumidor (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

De acordo com Chen; Mustapha (2012), a soja possui oligossacarídeos que podem funcionar como prebióticos e promover o crescimento e viabilidade de algumas estirpes probióticas que, por sua vez, metabolicamente geram a enzima α -galactosidase que hidroliza os

oligossacarídeos. Os oligossacarídeos de soja tem mostrado ser prontamente fermentado por bifidobactérias (CHEN; WEI; CHI, 2011). Assim, a adição desses micro-organismos em produtos de soja pode aumentar a digestão dos oligossacarídeos e, em adição, promover efeitos benéficos ao hospedeiro.

Estudo conduzido por Chen; Wei; Chi (2011) determinou a população bacteriana, além de pH, conteúdo de oligossacarídeos e isoflavonas em farinha de soja desengordurada fermentada por *L. paracasei* BCRC 14023 e *B. longum* BCRC 14661. Os resultados demonstraram que após 24 horas de incubação a 37 °C, a população bacteriana de *L. paracasei* e *B. longum* atingiu 9,66 e 9,69 UFC/g, sendo que os valores de pH reduziram de 6,77 para 4,98 e 4,99, respectivamente. Além disso, verificou-se redução significativa do conteúdo de oligossacarídeos e aumento da concentração de isoflavonas no produto inoculado com cada uma das culturas.

Ainda com relação à utilização de micro-organismos probióticos em produtos de cereais, a cultura probiótica de *B. lactis* foi introduzida em 2011 pela Nestlé na sua linha de cereais infantis trazendo para o mercado o novo Mucilon NutriPROTECT[®]+, uma combinação exclusiva da Nestlé que, além de vitaminas e minerais, contém o probiótico Bifidus BL[®], importante para manutenção de uma microbiota intestinal saudável. Segundo a empresa, o produto é o único cereal infantil no Brasil que traz a adição de uma cultura probiótica (NESTLÉ, 2011).

2.5.5. Café e chocolate

Além dos cereais, outro produto que mostrou potencial promissor sobre a microbiota intestinal foi o café. Jaquet et al. (2009) desenvolveram um estudo que avaliou o impacto do consumo moderado de café sobre a atividade metabólica e composição bacteriana da microbiota intestinal. Para analisar o conteúdo das fezes antes e após o consumo, a microbiota foi quantificada por meio de métodos baseados em DNA. Os resultados mostraram que indivíduos saudáveis após consumir três copos de café diariamente durante três semanas, apresentaram um aumento da população de *Bifidobacterim* spp. no intestino, bem como de sua atividade metabólica,

o que sugere que o produto pode apresentar um impacto positivo, quando consumido por indivíduos submetidos à terapias com antibióticos.

O chocolate, produto derivado das amêndoas do cacau, também pode ser considerado um veículo de culturas probióticas. Chocolate ao leite e chocolate amargo se mostrou um excelente carreador de *L. helveticus* CNCMI-1722 e *B. longum* CNCMI-3470 (POSSEMIERS et al., 2010). Os autores avaliaram a capacidade das culturas probióticas microencapsuladas em resistir ao processo de fabricação, a fim de chegar viável no produto final e verificaram constagens acima de 10^8 UFC/g para ambos os micro-organismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Unidade de Processamento de Frutas e Hortaliças, Laboratório de Microbiologia e de Físico-química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas (IF Sudeste MG), Câmpus de Rio Pomba – MG, além dos Laboratórios de Ciência de Produtos de Frutas e Hortaliças e de Análise sensorial e Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Processamento mínimo das frutas e elaboração da salada de frutas

As frutas, abacaxi, banana, goiaba, maçã, mamão e manga em estágio de maturação comercial foram adquiridas no comércio de Rio Pomba e encaminhadas para a Unidade de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG, onde foram armazenadas sob refrigeração (10 °C) até o início do processamento mínimo.

Para tanto, as frutas foram lavadas em água potável para eliminação de impurezas e sujidades e imersas em água a 5 °C, com adição de Sumaveg[®], Dicloroisocianurato de sódio, (Diversey Lever) na concentração de 200 mg.L⁻¹ de cloro residual ativo, por 20 minutos a fim de promover a inativação de micro-organismos. Em seguida, as frutas foram descascadas e cortadas manualmente em cubos de, aproximadamente, 1 cm x 1 cm com auxílio de facas de aço inoxidável. Após o corte de cada fruta, foi elaborada a salada contendo a mesma proporção de todas as frutas.

3.2. Inoculação de culturas probióticas na salada de frutas

Após o processamento mínimo e elaboração da salada, esta foi imersa em solução que continha, aproximadamente, 10¹⁰ UFC/mL da cultura probiótica de *L. acidophilus* LA-5 (Christian Hansen[®]). Inicialmente, com base em experiências anteriores de nosso grupo de pesquisa, esta cultura foi selecionada e inoculada às saladas utilizadas nos experimentos de seleção do melhor agente inibidor de escurecimento enzimático, uma vez

que se desejava verificar se os agentes utilizados não promoveriam a lavagem das células.

Posteriormente, após selecionar o agente inibidor de escurecimento, as culturas probióticas de *L. rhamnosus* HN001 (Danisco), *L. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen®) ou *L. plantarum* (Chr. Hansen®) foram preparadas e adicionadas individualmente à salada de frutas conforme Rößle et al. (2010a). Inicialmente, as culturas foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) e mantidas a 37 °C por 18 horas. Posteriormente, foram ativadas em caldo MRS, por 16 horas, sendo este submetido à centrifugação a 5 °C por 15 min, a 7000 g. O sobrenadante do meio de cultura foi descartado e o *pellet* de células obtido foi ressuscitado assepticamente em solução tampão constituída de ácido cítrico:citrato de sódio 1:1, pH 3,8. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado novamente em solução tampão de ácido cítrico: citrato de sódio 1:1, pH 3,8 na proporção de 1:10, ou seja, para cada grama de células foi adicionado 10 mL da solução tampão a fim de se obter no mínimo 10^{10} células/mL. Desta forma, a fim de se obter a salada de fruta contendo as culturas probióticas, para cada 1 grama de salada foi adicionado 1 mL da suspensão de células preparada previamente, sendo esta suspensão mantida em contato com o produto por 15 minutos. O controle do processo foi a salada de frutas minimamente processadas não adicionadas de culturas probióticas.

3.3. Tratamento da salada de frutas com compostos inibidores do escurecimento

A salada contendo *L. acidophilus* foi imersa em solução de ácido cítrico 1 % e 2 %, ácido ascórbico 1 % e 2 %, metabissulfito de sódio 0,01 % e 0,03 % e cloridrato de cisteína 0,5 % e 1 % por 3 minutos, a 5 °C a fim de avaliar o melhor composto quanto à efetividade em inibir ou retardar o escurecimento enzimático. O controle do processo constou de salada de fruta imersa somente em água.

Em seguida, a salada de fruta foi drenada para retirada do excesso de solução, acondicionada em embalagens apropriadas e armazenada a 8 °C

para realização das análises nos tempos 0 h, 24 h, 72 h e 120 h de processamento. Todos os experimentos foram realizados em três repetições.

O agente inibidor selecionado nesta etapa foi utilizado posteriormente no processamento das saladas contendo *L. rhamnosus* HN001 (Danisco), *L. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen®) ou *L. plantarum* (Chr. Hansen®).

3.4. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO)

A atividade de PPO da salada de frutas controle e contendo *L. acidophilus* e imersa nos compostos inibidores de escurecimento foi determinada de acordo com Melo; Vilas Boas (2006) nos tempos 0 h, 24 h, 72 h e 120 h de processamento. O extrato foi obtido macerando-se 10 g de frutas com 0,5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), três gotas de Triton X-100 e 20 mL de solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7, mantido sob refrigeração. O homogeinato foi imediatamente filtrado em tecido de algodão e centrifugado por 10 min, a 5.000 g, a 0 °C. O sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação de atividade enzimática, sendo uma alíquota de 1 mL do extrato obtido adicionada de 3,6 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7 e 0,1 mL de catecol 10 mM que foi deixado em repouso por 30 minutos em banho maria a 30 °C. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1,6 mL de ácido perclórico 2 N.

A atividade enzimática de polifenoloxidase foi expressa em unidade por grama de matéria fresca por minuto (U/g.min). Uma unidade correspondeu à atividade enzimática capaz de alterar 0,001 de absorbância a 395 nm.

3.5. Determinação de cor

Após imersão da salada de fruta em solução contendo *L. acidophilus* e adição dos diferentes compostos inibidores do escurecimento, a cor superficial foi avaliada utilizando-se o colorímetro Miniscan EZ, HunterLab (Reston, Virgínia, USA), nos tempos 0 h, 24 h, 72 h e 120 h de processamento.

A determinação de cor foi realizada pela leitura direta de reflectância das coordenadas L^* , a^* e b^* , empregando a escala CIELAB L^* , sendo que L^* mede a luminosidade e varia de 0 (preto) a 100 (branco), a^* indica a posição da cor entre vermelho (+a) e verde (-a) e a coordenada b^* entre amarelo (+b) e azul (-b). O índice de cor (IC) que mede a cor característica do produto, o índice de escurecimento (IE), a intensidade de cor ou Chroma (c^*) e ângulo hue (h°) e o ΔE que mede a diferença de cor entre a fruta fresca e a processada, foram determinados segundo Mazzuz (1996), Palou et al. (1999), McGuire (1992) e Rößle et al. (2009), respectivamente, sendo calculados de acordo com as equações 1, 2, 3, 4 e 5:

$$IC = 1000 \times a^* / L^* \times b^* \quad (1)$$

$$IE = [100 (X-0,31)]/0,172 \quad (2)$$

$$\text{onde } X = (a^* + 1,75L^*) / (5,645L^* + a^* - 3,02b^*)$$

$$c^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{-1/2} \quad (3)$$

$$h^\circ = \arctang (b^*/a^*) \quad (4)$$

$$\Delta E^* = [(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2]^{0,5} \quad (5)$$

Para medir a cor, as saladas dos tratamentos controle e adicionada de *L. acidophilus* e tratadas com os diferentes compostos inibidores de escurecimento foram trituradas e colocadas em uma placa de vidro, sendo o valor de L^* , a^* e b^* para cada amostra fornecidos a partir da leitura direta sobre o produto.

3.6. Determinação da viabilidade das culturas probióticas em salada de frutas minimamente processadas

Amostras de 25 g da salada de frutas foi homogeneizada em 225 mL de solução salina peptonada (0,85 % de NaCl e 0,1 % de peptona). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas. A contagem foi efetuada pelo método de plaqueamento em profundidade ou "*pour plate*",

adicionando-se 1 mL das respectivas diluições e derramando-se pequena quantidade de ágar Rogosa SL (Himedia) em placas de Petri que foram posteriormente mantidas em jarras de anaerobiose a 37 °C por 72 h.

Inicialmente, a fim de selecionar o melhor agente inibidor do escurecimento, a salada foi inoculada com *L. acidophilus* sendo a contagem do mesmo nas saladas de frutas dos tratamentos controle e adicionada de compostos inibidores de escurecimento nas maiores concentrações (ácido cítrico 2 %, ácido ascórbico 2 %, metabissulfito de sódio 0,03 % e cloridrato de cisteína 1 %), realizada após 0 h e 120 h de produção das saladas de frutas minimamente processadas armazenadas a 8 °C. A viabilidade de *L. acidophilus* foi determinada somente nas saladas que continham os compostos inibidores de escurecimento nas maiores concentrações, uma vez que se desejava verificar se estes compostos não inibiriam a sobrevivência da cultura probiótica.

Após a seleção do agente inibidor do escurecimento, foi determinada a contagem das culturas probióticas de *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* LA-5 ou *L. plantarum* na salada de frutas inoculada individualmente com as 3 culturas e tratadas com o agente inibidor do escurecimento selecionado.

3.7. Avaliação da adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos em salada de frutas ao longo do tempo de armazenamento

Após tratamento da salada de frutas com micro-organismos probióticos (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus* ou *L. plantarum*), foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura de cada fruta componente da salada a fim de verificar a adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos ao tecido vegetal com 0h e 120h de armazenamento, a 8 °C.

3.7.1. Preparo das amostras

As frutas 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 frutas ficou voltada em direção ao feixe de elétrons.

3.7.2. Desidratação das amostras e metalização com ouro

Para a fixação das células e do tecido vegetal, os fragmentos de cada fruta foram transferidos para solução de glutaraldeído 5 % (v/v) em tampão fosfato 0,1 M, 1:1, de forma que a concentração final fosse 2,5 % de glutaraldeído e tampão fosfato 0,05M. Os fragmentos das frutas permaneceram nesta solução 18 horas a 7 °C. Em seguida, foi realizada lavagem de 1 minuto em tampão PBS 0,05 mol/L, pH 7,2. A etapa de desidratação consistiu de tratamentos seriados em acetona, nas graduações de 30 °GL, 50 °GL, 70 °GL e 90 °GL, por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 min, em acetona 100 °GL. Os cortes das frutas foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer – modelo CPD020, Balzers, Liechstenstein) para a desidratação total e, então metalizados 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.

3.8. Determinação de textura

A textura das frutas minimamente processadas na salada contendo ácido ascórbico 1% e adicionada de culturas probióticas de *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* foi determinada em analisador de textura (CT3, BrookField), nos tempos 0h, 24h, 72h e 120h de processamento.

A firmeza das frutas, expressa em Newton (N), foi determinada por teste de compressão. Três cubos de cada fruta foram utilizados, posicionando-os individualmente sobre uma superfície lisa, sendo pressionados por um “probe” (SMSP/35) de 3,5 cm de diâmetro e 5 mm/s de velocidade, posicionado a uma distância de 60 mm da amostra.

As frutas foram analisadas e selecionadas a fim de que apresentassem, aproximadamente, o mesmo diâmetro e altura, para garantir uniformidade das amostras.

3.9. Análises físico-químicas

3.9.1. Determinação de pH, acidez e teor de sólidos solúveis (°Brix)

As análises físico-químicas de pH e acidez foram realizadas nos tempos 0h, 24h, 72h e 120h de armazenamento a 8 °C, de acordo com Zenebon; Pascuet (2004). As amostras das frutas presentes nas saladas dos tratamentos controle e contendo isoladamente as culturas probióticas de *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* e adicionadas de ácido ascórbico 1 % foram trituradas e diluídas em 100 mL de água destilada. O pH foi determinado em potenciômetro (Gehaka TG1800). Para determinar a acidez em percentual de ácido orgânico (ácido cítrico) correspondente à salada de fruta, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína sobre o homogenato que foi titulado com NaOH 0,1 N até mudança da cor para rósea.

Os sólidos solúveis da salada de frutas minimamente processada dos tratamentos controle e adicionadas de culturas probióticas foram determinados por refratometria, usando-se refratômetro tipo ABBE, de acordo com Zenebon; Pascuet (2004) nos tempos 0h, 24h, 72h e 120h de armazenamento a 8 °C.

3.9.2. Determinação de vitamina C

A vitamina C da salada de frutas dos tratamentos controle e adicionada de cultura probiótica de *L. rhamnosus*, que apresentou melhor viabilidade celular, foi determinada pelo Método de Tillmans de acordo com Zenebon; Pascuet (2004) nos tempos 0h, 24h, 72h e 120h de armazenamento a 8 °C. Este método se baseia na redução do corante 2,6 diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C.

O resultado foi expresso em miligramas de ácido ascórbico/100 g de polpa de fruta de acordo com a fórmula:

$$\text{Ácido ascórbico mg/100 g de polpa} = \frac{V \times F \times 100}{A}$$

Onde:

V: volume solução de Tillmans gasto na titulação

F: fator da solução de Tillmans

A: g da amostra

3.9.3. Determinação de carotenóides totais

Os carotenóides totais das saladas de frutas dos tratamentos controle e adicionada de cultura probiótica de *L. rhamnosus*, que apresentou melhor viabilidade celular, foram extraídos seguindo metodologia descrita por Rodrigues-Amaya (2001), utilizando acetona como solvente extrator e quantificado nas amostras por medidas espectrofotométricas. As análises foram realizadas em espectrofotômetro a 450 nm, nos tempos 0h e 120h de armazenamento a 8 °C. O conteúdo de carotenóides foi expresso por:

$$\text{mg/g} = \frac{V \times A \times 10}{P \times E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

Onde:

V: volume do extrato

A: absorvância

P: peso da amostra

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: coeficiente de absorvidade molar = 2592 a 450 nm

3.10. Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas de coliformes a 30 °C e coliformes a 45 °C pela técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com Kornacki e Johnson (2001), utilizando-se caldo Lauril Sulfato Triptose para o teste presuntivo, Caldo Bile Verde Brilhante para confirmar coliformes

a 30 °C e Caldo EC para confirmar coliformes que fermentam a 45 °C. O resultado foi expresso em NMP por grama de salada de fruta.

A determinação de *Salmonella* sp. foi realizada em 25 g do produto homogeneizado em 225 mL de água peptonada tamponada seguindo a metodologia descrita por Andrews et al. (2001) e a contagem de microorganismos psicotróficos foi determinada segundo Cousin; Jay; Vasavada (2001) utilizando-se Ágar Padrão para Contagem (PCA) e incubação a 7 °C por 10 dias. Para a contagem das colônias de psicotróficos, foram selecionadas as placas contendo de 25 a 250 colônias e, posteriormente, foi calculado o número de UFC (unidades formadoras de colônias) por grama do produto.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicata, para ambos os tratamentos (saladas de fruta controle e contendo culturas probióticas), nos tempos 0h e 120h de armazenamento, a 8 °C a fim de avaliar se o produto atende aos padrões de qualidade microbiológica estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

3.11. Análise sensorial da salada de frutas

O teste de aceitação das saladas de fruta dos tratamentos controle e adicionada de cultura probiótica de *L. rhamnosus*, que apresentou melhor viabilidade celular, foi realizado por 50 consumidores não treinados, utilizando escala hedônica de nove pontos, variando-se de “gostei extremamente” (escore 9) a “desgostei extremamente” (escore 1) para os atributos cor, sabor e impressão global, segundo Minim (2006), após 0h e 120h de armazenamento a 8 °C.

Os dados do teste de aceitação para os atributos cor, sabor e impressão global foram analisados por Delineamento Inteiramente Casualizado, em esquema fatorial 2x2, sendo duas amostras (salada de frutas controle e contendo *L. rhamnosus*) e 2 tempos de armazenamento (0 e 120 horas).

3.12. Análise estatística

No experimento de seleção do melhor composto inibidor de escurecimento, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e esquema de parcelas subdivididas, com 8 tratamentos e um controle nas parcelas, com 3 repetições. As avaliações ao longo do tempo de armazenamento (0 h, 24 h, 72 h e 120 h) constituíram as subparcelas. Realizou-se análise de variância. O teste de Tukey foi aplicado para comparações múltiplas entre médias. O fator tempo de armazenamento foi estudado por regressão linear, sendo a escolha do modelo feita de acordo com o coeficiente de determinação.

A viabilidade de *L. acidophilus* foi avaliada utilizando delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e esquema fatorial 4x2, sendo quatro antioxidantes (cloridrato de cisteína 1 %, ácido ascórbico 2 %, ácido cítrico 2 %, metabissulfito de sódio 0,03 %) e 2 tempos de armazenamento (0 e 120 horas). Realizou-se análise de variância e teste de Tukey para comparações múltiplas de médias.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições para o experimento de viabilidade das culturas probióticas de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. plantarum*. Após realização da análise de variância. As médias dos diferentes tratamentos (salada de fruta controle e saladinha de fruta contendo micro-organismos probióticos) foram comparadas pelo teste de Tukey.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições no experimento para as análises de textura, pH, acidez e °Brix. Realizou-se análise de variância. As médias dos diferentes tratamentos (salada de fruta controle e saladinha de fruta contendo micro-organismos probióticos) foram comparadas pelo teste de Tukey.

Para vitamina C foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, e esquema fatorial 2x4, sendo dois tratamentos (salada de fruta controle e contendo *L. rhamnosus*) e 4 tempos de armazenamento (0, 48, 72 e 120 horas). Análise de variância foi realizada. O fator tempo também foi estudado por regressão linear, sendo a escolha do modelo de acordo com o coeficiente de determinação.

Para carotenóides totais também foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, e esquema fatorial 2x2, sendo dois tratamentos (salada de fruta controle e contendo *L. rhamnosus*) e 2 tempos de armazenamento (0 e 120 horas). Apenas o teste F da análise de variância foi aplicado para fazer inferências.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados considerando o nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de PPO e cor da salada de frutas contendo *L. acidophilus* e compostos inibidores do escurecimento

A cor das frutas presentes na salada foi afetada pelo processamento e pelo período de armazenamento. Verificou-se diferença ($p < 0,05$) da atividade enzimática de polifenoloxidase pelo teste de Dunnett entre as saladas de frutas do tratamento controle e as tratadas com ácido ascórbico 1 % e 2 % e cloridrato de cisteína 0,5 % e 1 %, sendo estes os melhores agentes inibidores do escurecimento, que apresentaram menores atividades enzimáticas quando comparadas as tratadas com metabissulfito de sódio 0,01 % e 0,03 % e ácido cítrico 1 % e 2 % que não diferiram do controle o qual apresentou atividade média de PPO de 1,67 U/g.min (Tabela 2).

Sabe-se que o escurecimento dos tecidos vegetais se deve ao rompimento da membrana celular, que promove a liberação de enzimas que entram em contato com os substratos fenólicos, havendo, assim, uma oxidação descontrolada dos mesmos com utilização do oxigênio molecular (JESUS et al., 2008).

Com relação à luminosidade (L^*), não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Porém, verificou-se que o tempo foi significativo ($p < 0,05$) para L^* , ou seja, ao longo do tempo houve escurecimento das frutas presentes na salada (Figura 1A).

O escurecimento é uma característica de aparência que compõe a cor de frutas minimamente processadas. Fontes; Sarmiento; Spoto (2007) observaram menor escurecimento em maçãs minimamente processadas do tratamento adicionado de solução conservadora contendo agentes antioxidantes (ácido cítrico e ácido ascórbico) presentes na solução. De acordo com os autores, as maçãs deste tratamento destacaram-se por apresentarem características mais próximas de uma maçã natural recém cortada.

Tabela 2. Resultados médios para determinação de PPO e de cor (L*, a*, b*, IC, IE, c* e h°) de saladas de frutas adicionadas de compostos inibidores do escurecimento (tratamentos)

| Tratamentos | PPO | L* | a* | b* | IC | IE | c* | h° |
|-------------|----------|---------|---------|---------|-----------|----------|---------|---------|
| AA1 | 1,26 bBC | 57,60aA | 23,89aA | 33,51aA | 12,56aAB | 112,66aA | 41,28aA | 1,26aAB |
| AA2 | 1,23 bBC | 57,46aA | 23,70aA | 32,33aA | 12,85 aAB | 108,57aA | 40,13aA | 1,24 aB |
| CC05 | 1,30 bBC | 57,18aA | 23,99aA | 32,45aA | 12,98 aA | 110,05aA | 40,30aA | 1,23 aB |
| CC1 | 1,18 bC | 59,04aA | 22,57aA | 33,43aA | 11,57aABC | 107,12aA | 40,39aA | 1,34aAB |
| MS001 | 1,67 aA | 57,64aA | 22,40aA | 35,87aA | 11,11aABC | 119,41aA | 42,40aA | 1,44aAB |
| MS003 | 1,53 aAB | 58,65aA | 21,74aA | 34,66aA | 10,81aABC | 111,27aA | 40,96aA | 1,44aAB |
| AC1 | 1,65 aA | 58,89aA | 21,83aA | 36,85aA | 10,09 aC | 119,13aA | 42,86aA | 1,50 aA |
| AC2 | 1,44aABC | 58,78aA | 22,75aA | 37,35aA | 10,48 aBC | 122,10aA | 43,80aA | 1,46aAB |
| Cont. | 1,67 aA | 56,69aA | 22,92aA | 34,12aA | 12,07aABC | 116,74aA | 41,18aA | 1,34aAB |
| DMS-Dunnett | 0,26 | 2,57 | 2,49 | 5,36 | 1,99 | 20,72 | 4,96 | 0,20 |
| DMS-Tukey | 0,32 | 3,07 | 2,97 | 6,39 | 2,38 | 24,72 | 5,92 | 0,24 |

AA1: ácido ascórbico 1 %; AA2: ácido ascórbico 2 %; CC05: Cloridrato de cisteína 0,5 %; CC1: Cloridrato de cisteína 1 %; MS001: Metabissulfito de sódio 0,01 %; MS003: Metabissulfito de sódio 0,03 %; AC1: ácido cítrico 1 %; AC2: ácido cítrico 2 %; Cont.: Controle.

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett e pelo teste de Tukey, respectivamente.

Para os parâmetros a* e b* também não foi observado diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2). Porém, evidenciou-se a influência do tempo de estocagem sobre esses parâmetros (Figuras 1B e 1C), havendo um aumento dos valores de a*, que tende ao vermelho, e redução dos valores de b*, que tende ao azul, durante o armazenamento, resultado semelhante ao observado por Melo; Vilas Boas; Justo (2009) que também constataram aumento dos valores de a* de banana maçã minimamente processada com o tempo de armazenamento para os tratamentos utilizados.

O índice de cor (IC) varia de -20 a +20, sendo que quanto mais negativo, mais verde é a cor da fruta e quanto mais positivo, mais intensa é a coloração vermelha da fruta (MAZZUZ, 1996). No presente estudo, constatou-se um aumento do índice de cor ao longo do tempo de armazenamento ($p < 0,05$) das saladas de frutas (Figura 2). Observou-se também pelo teste de Dunnett que não houve diferença ($p > 0,05$) de IC entre os tratamentos. Porém quando os mesmos foram avaliados pelo teste de Tukey ao mesmo nível de probabilidade, constatou-se que a salada de fruta tratada com cloridrato de cisteína 0,5 % diferiu ($p < 0,05$) daquelas adicionadas de ácido cítrico 1 % e 2 % (Tabela 2), o que indicou que o uso do cloridrato de cisteína contribuiu para manutenção da coloração vermelha das frutas. Este resultado foi evidenciado também por meio do maior valor

de a^* (23,99) para a salada de fruta tratada com cloridrato de cisteína 0,5 % quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2).

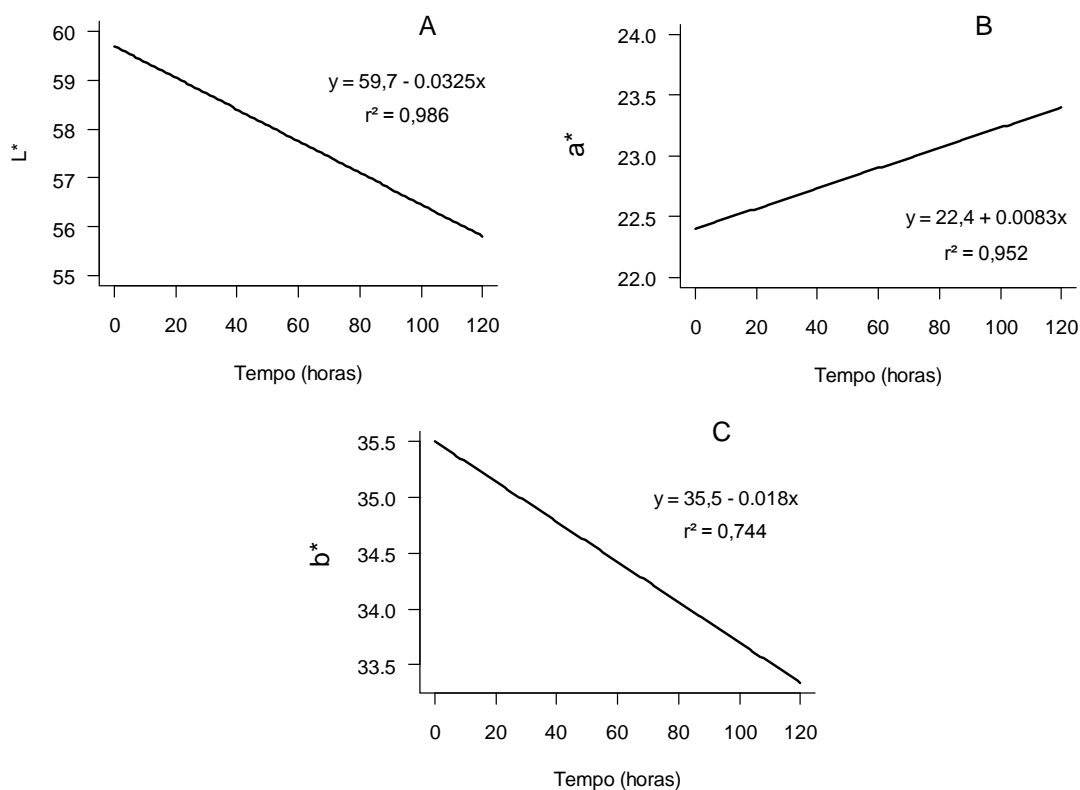


Figura 1 – Equação de regressão e coeficiente de determinação das coordenadas L^* (A), a^* (B) e b^* (C) de saladas de frutas minimamente processadas submetidas a diferentes tratamentos por 3 minutos a 5 °C e armazenadas por 120 horas.

Verificou-se também que as frutas maçã e banana presentes nas saladas apresentaram coloração rósea superficial indesejável ao longo do tempo de armazenamento quando tratadas com cloridrato de cisteína 0,5 %. Melo; Vilas Boas (2006) verificaram que quanto menor a concentração de cisteína, maior foi a intensidade de roseamento de banana maçã minimamente processada e, segundo os autores, isto se deve provavelmente a regeneração de fenóis quando a quantidade de cisteína aplicada é baixa, o que explica provavelmente a cor rósea constatada em maçã e banana tratadas somente com 0,5 % deste composto.

Constatou-se para os tratamentos avaliados um aumento do índice de escurecimento (IE), que mede a pureza da cor marrom, ao longo do tempo de armazenamento das saladas de frutas a 8°C ($p < 0,10$), o que está de acordo com os resultados de Fontes et al. (2008), que ao trabalharem com coberturas comestíveis em maçã minimamente processada também observaram aumento do índice de escurecimento em função do tempo de armazenamento. Porém, no presente trabalho não foi constatado diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2).

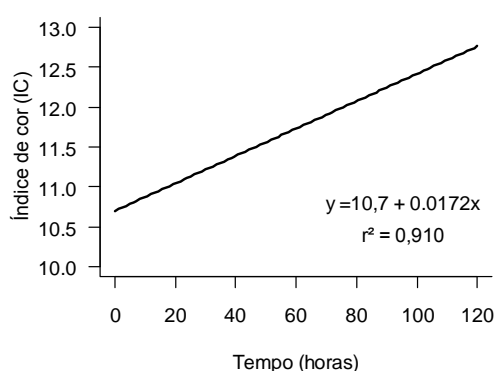


Figura 2 – Equação de regressão e coeficiente de determinação do índice de cor (IC) de saladas de frutas minimamente processadas submetidas a diferentes tratamentos por 3 minutos a 5 °C e armazenadas por 120 horas.

Outra característica da cor avaliada foi o índice Chroma (c^*), que denota sobre 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”), aspecto desejado para os alimentos (CARDOSO et al., 2007). Verificou-se neste trabalho que não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), tendo este índice um valor médio entre os tratamentos de 41,47 (Tabela 2). Como o c^* assumi valores próximos a zero para cores neutras (cinza) e ao redor de 60 para cores vívidas, verificou-se no presente estudo que apesar do tempo ter causado impacto negativo sobre a intensidade da cor ($p < 0,1$) das frutas presentes nas saladas dos diferentes tratamentos, estas ainda mantiveram sua coloração mais próxima das cores vivas.

O ângulo de cor (h°) é um parâmetro muito utilizado também para expressar a variação da coloração em produtos vegetais (McGUIRE, 1992). O h° assume valor zero para a cor vermelha, 90° para amarela, 180° para verde e 270° para azul. Observou-se que as saladas de frutas apresentaram valores de h° que variaram de $1,23^{\circ}$ a $1,50^{\circ}$ (Tabela 2), situando-se no primeiro quadrante, o que evidencia a predominância da coloração vermelha do conjunto de frutas presentes na salada.

Outra característica avaliada foi o ΔE^* que mede a diferença de cor entre a fruta fresca e a processada. Quanto maior o valor de ΔE^* , maior a diferença total de cor do produto processado em relação ao produto original. Como se objetivou neste estudo utilizar diferentes antioxidantes a fim de retardar o escurecimento das frutas para que se obtivesse ao longo do período de armazenamento um produto semelhante à sua forma fresca, mantendo as características originais da fruta, quanto menor o ΔE^* , melhor o resultado. Assim, verificou-se diferença significativa ($p < 0,01$) entre o tratamento controle ($\Delta E^* = 6,74$) e aquele tratado com ácido cítrico 2% ($\Delta E^* = 3,24$) ao longo do período de armazenamento, evidenciando que este ácido conservou a cor das saladas de frutas minimamente processadas.

A partir dos resultados obtidos, constatou-se que o cloridrato de cisteína 0,5 % influenciou a aparência da salada de frutas, além de deixar sabor residual no produto. Dessa forma, o ácido ascórbico 1 % foi selecionado como agente inibidor do escurecimento das saladas de frutas, sendo utilizado nos experimentos posteriores.

4.2. Viabilidade de *L. acidophilus* na salada de frutas contendo os agentes inibidores do escurecimento em maiores concentrações

Com relação à viabilidade de *L. acidophilus* na salada de frutas minimamente processada, constatou-se que a contagem de bactérias lácticas variou de 8,38 Log UFC/g para a salada de frutas adicionada de metabissulfito de sódio 0,03 % a 8,53 Log UFC/g para a salada de frutas adicionada de cloridrato de cisteína 1 %, logo após o processamento (tempo 0). Os compostos inibidores utilizados não influenciaram ($p > 0,05$) a viabilidade de *L. acidophilus* (Tabela 3). Entretanto, após 120 horas de

armazenamento a 8 °C, observou-se redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade de *L. acidophilus*.

Rößle et al. (2010a) utilizaram *L. rhamnosus* em maçãs minimamente processadas tratadas com o antioxidante Natureseal® e verificaram que, após 10 dias de armazenamento, o produto continha 10^8 UFC/g desta bactéria. Estes autores concluíram que o produto é uma alternativa para consumidores de alimentos probióticos e que poderia ser particularmente utilizado por crianças.

Tabela 3 – Média da contagem de bactérias lácticas (Log UFC/g) em salada de frutas minimamente processadas adicionadas de compostos inibidores de escurecimento, após 0 e 120 horas de processamento e armazenamento a 8 °C

| Tratamentos | CC 1 % | AA 2 % | AC 2 % | MS 0.03 % | Média |
|-------------|--------|--------|--------|-----------|--------|
| Tempo | | | | | |
| 0 h | 8.53 | 8.42 | 8.50 | 8.38 | 8.46 a |
| 120 h | 7.61 | 7.61 | 7.42 | 7.32 | 7.49 b |
| Média | 8.07 A | 8.01 A | 7.96 A | 7.85 A | |

CC1: Cloridrato de cisteína 1 %; AA2: ácido ascórbico 2 %; AC2: ácido cítrico 2 %; MS 003: Metabissulfito de sódio 0,03 %.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, respectivamente, não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Não está claro na literatura a concentração mínima de micro-organismos probióticos necessária para promover o efeito benéfico no organismo hospedeiro. Alguns pesquisadores sugerem concentrações maiores que 10^6 UFC/g (DAVE; SHAH, 1997a; SAAD, 2006) enquanto outros sugerem concentrações de pelo menos 10^7 a 10^8 UFC/g (LOURENS-HATTINGH; VILJEON, 2001). Dessa forma, com base na literatura consultada, a salada de frutas desenvolvida neste estudo utilizando diferentes antioxidantes pode ser considerada veículo de bactérias probióticas uma vez que contêm acima de 10^7 UFC de *L. acidophilus* por grama do produto, além de poder ser consumida por crianças, idosos, indivíduos vegetarianos, intolerantes a lactose e pessoas com restrição de colesterol na dieta.

4.3. Viabilidade de micro-organismos probióticos em salada de frutas minimamente processadas ao longo do armazenamento

Verificou-se que a viabilidade dos micro-organismos probióticos nas saladas de frutas se manteve acima de 7,83 Log UFC/g ao longo das 120 horas de armazenamento a 8 °C (Tabela 4), sendo o produto considerado probiótico por conter acima de 7,00 Log UFC/g. Assim, uma embalagem contendo 100 gramas de salada de frutas probiótica oferece ao consumidor uma população de 9,83 Log UFC/g, quantidade suficiente de bactérias para promover benefícios ao organismo hospedeiro (DAVE; SHAH, 1997a; SAAD, 2006).

A avaliação da viabilidade de *L. rhamnosus* HN001 em melão minimamente processado armazenados a 6 °C e 15 °C foi assunto de estudo de Oliveira P. et al. (2011). Contagens da cultura probiótica acima de 8,0 Log UFC/g por até 120 horas de armazenamento foram observadas, o que sugere que o melão é uma fruta com ótimo potencial para adição de micro-organismos probióticos.

Observou-se também no presente estudo que o fator tempo não influenciou ($p>0,05$) a viabilidade das culturas e não houve interação entre tempo e probiótico ($p>0,05$). No entanto, os micro-organismos probióticos diferiram entre si ($p<0,05$) quanto à viabilidade, sendo *L. rhamnosus* a cultura mais viável (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da contagem (Log UFC/g) de bactérias probióticas em salada de frutas minimamente processadas em diferentes tempos de armazenamento

| Probiótico | Médias de viabilidade |
|-----------------------|-----------------------|
| <i>L. rhamnosus</i> | 8.49 a |
| <i>L. acidophilus</i> | 7.96 b |
| <i>L. plantarum</i> | 7.83 b |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como não houve interação significativa entre os tratamentos (culturas probióticas) e o tempo, os micro-organismos foram estudados isoladamente. A regressão da viabilidade está apresentada na Figura 3, onde cada ponto

se refere à média de todos os probióticos em 3 repetições. Portanto, cada ponto vem de 9 observações.

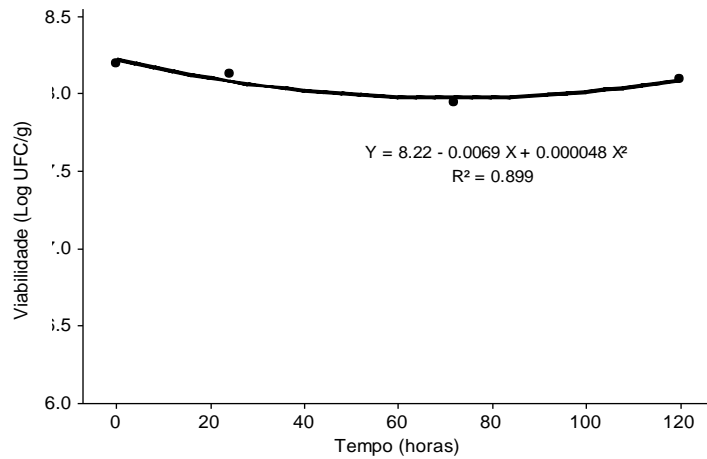


Figura 3. Regressão da viabilidade dos micro-organismos probióticos em saladas de frutas em função do tempo de armazenamento.

Manter a viabilidade dos micro-organismos probióticos durante o período de armazenamento representa um desafio tecnológico, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição à oxigênio, calor e ácidos. No presente estudo, a fim de minimizar o escurecimento enzimático das frutas, selecionou-se como agente inibidor ácido ascórbico 1 %. Assim, para sua conservação, as frutas minimamente processadas sofreram a adição deste composto, que de acordo com Saad et al. (2011), leva a redução do potencial redox do produto, o que é positivo para o gênero *Lactobacillus*, que apresenta, em sua maioria, metabolismo microaerófilo.

Diferente da matriz vegetal, Dave; Shah (1997a) estudaram a viabilidade de bactérias probióticas durante a fabricação e armazenamento de iogurtes suplementados com ácido ascórbico por 35 dias e constataram que a contagem de *L. acidophilus* durante a estocagem decresceu mais lentamente com o aumento da concentração de ácido ascórbico. Em outro estudo, Dave; Shah (1997b) avaliaram a viabilidade de *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus* e bifidobactéria em leites fermentados adicionados de cisteína e observaram que a viabilidade de *L. acidophilus* foi mantida com a adição deste composto, sendo superiores a 5,0 Log UFC/mL

durante os 35 dias de armazenamento do produto. Dessa forma, com base nestes estudos percebe-se que a adição de compostos inibidores do escurecimento contribui para manter a viabilidade das culturas, por atuarem na redução do potencial redox do produto.

4.4. Avaliação da adesão, distribuição e morfologia dos micro-organismos probióticos ao tecido das frutas por microscopia eletrônica de varredura

O tecido vegetal é formado de sistemas multi-fásicos, com uma micro-estrutura interna intrincada constituída por células, espaços inter-celulares, poros e capilares. A parede celular vegetal, quando intacta, constitui uma barreira física eficiente contra o ataque de micro-organismos (BRACKETT; SPLITTSTOESSER, 2001). No entanto, de acordo com Oliveira M. et al. (2011), as etapas do processamento mínimo de vegetais, tais como descascamento e corte promovem danos no tecido vegetal promovendo a liberação de exsudado celular rico em minerais, açúcares, vitaminas e outros nutrientes, criando, assim, condições ideais para o crescimento microbiano. De acordo com Rößle et al. (2010a), estas condições viabilizam a produção destes alimentos como veiculadores de micro-organismos probióticos e resultados similares foram observados no presente estudo.

Pela figura 4A e 4B, pode-se observar que os tecidos das frutas banana e maçã danificados pelo processamento mínimo permitiram a entrada e abrigo das células bacterianas e constituíram-se em sítios de adesão oferecendo condições que favorecem a internalização microbiana, provavelmente devido à abundância de nutrientes exsudados desses locais.

Segundo Solomon; Brandl; Mandrell (2006), para sobreviverem, as bactérias alojam-se em estruturas com espaços interconectados e adaptam-se a um habitat heterogêneo, mas com alto potencial de oferecer condições para seu crescimento, em função da presença de água e nutrientes, como é o caso do tecido das frutas.

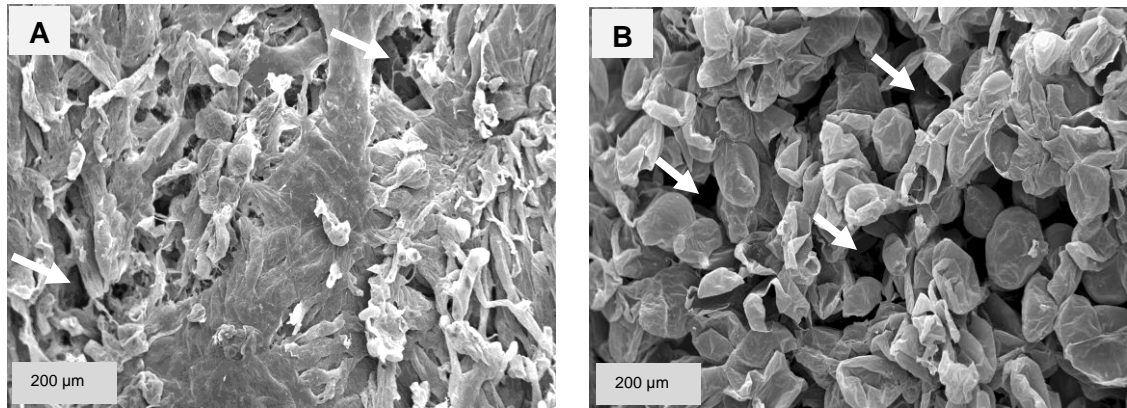


Figura 4 – Fotomicrografia da superfície de banana (a) e de maçã (b) logo após o processamento mínimo (tempo 0) com sítios (indicados por setas) com potencial para adesão microbiana.

Nas fotomicrografias observou-se elevado número de *L. rhamnosus* (Figuras 5 e 6), *L. acidophilus* (Figuras 7 e 8) e *L. plantarum* (Figuras 9 e 10) aderidos à superfície das frutas minimamente processadas. Verificou-se também que as células se encontram predominantemente bem distribuídas no tecido vegetal das diferentes frutas, havendo em algumas frutas a formação de um aglomerado de células aderidas ao tecido. Não foi observada alteração da morfologia das células em função de estresse, como o baixo pH do tecido vegetal, havendo predominância da forma de bastonetes.

Constatou-se que as culturas probióticas apresentam boa capacidade para adesão em todas as frutas avaliadas. Entretanto, observou-se maior adesão das culturas em banana, maçã e goiaba. A adesão das culturas probióticas ao tecido dessas frutas pode ser atribuído à micro-estrutura e formato desses vegetais que abrigam os micro-organismos em nichos que viabilizam sua sobrevivência. Além disso, as características intrínsecas da micro-arquitetura da superfície do vegetal, devido à presença de rugosidades e de compostos prebióticos naturais, como os oligossacarídeos, protegem também os micro-organismos probióticos do ambiente ácido do estômago, além de ser fonte de nutrientes, influenciando positivamente sua sobrevivência (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Segundo Mitsou et al. (2011), a banana contém quantidades consideráveis de frutooligossacarídeos prebióticos que induzem o efeito

bifidogênico em humanos. A presença desses frutanos justifica a elevada adesão de *L. acidophilus* (Figura 7B) ao tecido da fruta utilizada na salada elaborada nesse estudo, sendo a banana uma fruta promissora para veicular culturas probióticas.

A maçã é uma fruta rica em carboidratos, pectina, fibra bruta e minerais, sendo uma boa fonte de nutrientes (MAHAWAR; SINGH; JALGAONKAR, 2012) para as culturas probióticas. No presente trabalho, constatou-se alto número de células de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* aderidos ao tecido dessa fruta (Figuras 6A e 10A). Ainda com relação à maçã, segundo Alzamora et al. (2005), os espaços intercelulares, comumente chamados de poros, presentes no tecido parenquimatoso desta fruta podem desempenhar um papel importante na penetração de micro-organismos, uma vez que ocupam de 20 a 25 % do volume total da fruta. Esses poros são grandes o suficiente para garantir a passagem microbiana para o interior do produto. Células maduras do parênquima da maçã, por exemplo, podem apresentar tamanho de 50 a 500 µm de diâmetro, e a maioria das células bacterianas variam de 0,2 a 2,0 µm de diâmetro e de 2,0 a 8,0 µm de comprimento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007), o que garante a internalização das culturas probióticas nos compartimentos celulares de frutas, como a maçã.

Betoret et al. (2003) e Alzamora et al. (2005) estudaram a impregnação à vácuo de bactérias probióticas em maçã com resultados promissores, sendo a maçã usada como fruta modelo neste processo. De acordo com os autores, matrizes de frutas são, certamente, uma área importante de pesquisa e desenvolvimento com grande potencial para o mercado de alimentos funcionais. Segundo Kourkoutas; Kanellaki; Koutinas (2006), frutas como maçã, por conterem celulose, podem exercer um possível efeito protetor sobre os micro-organismos probióticos durante a passagem pelo trato intestinal, garantindo que culturas probióticas a exemplo de *L. casei* chegue até o cólon e promova efeitos benéficos ao hospedeiro, uma vez que esta fruta contém os pré-requisitos necessários para adesão do probiótico ao tecido vegetal.

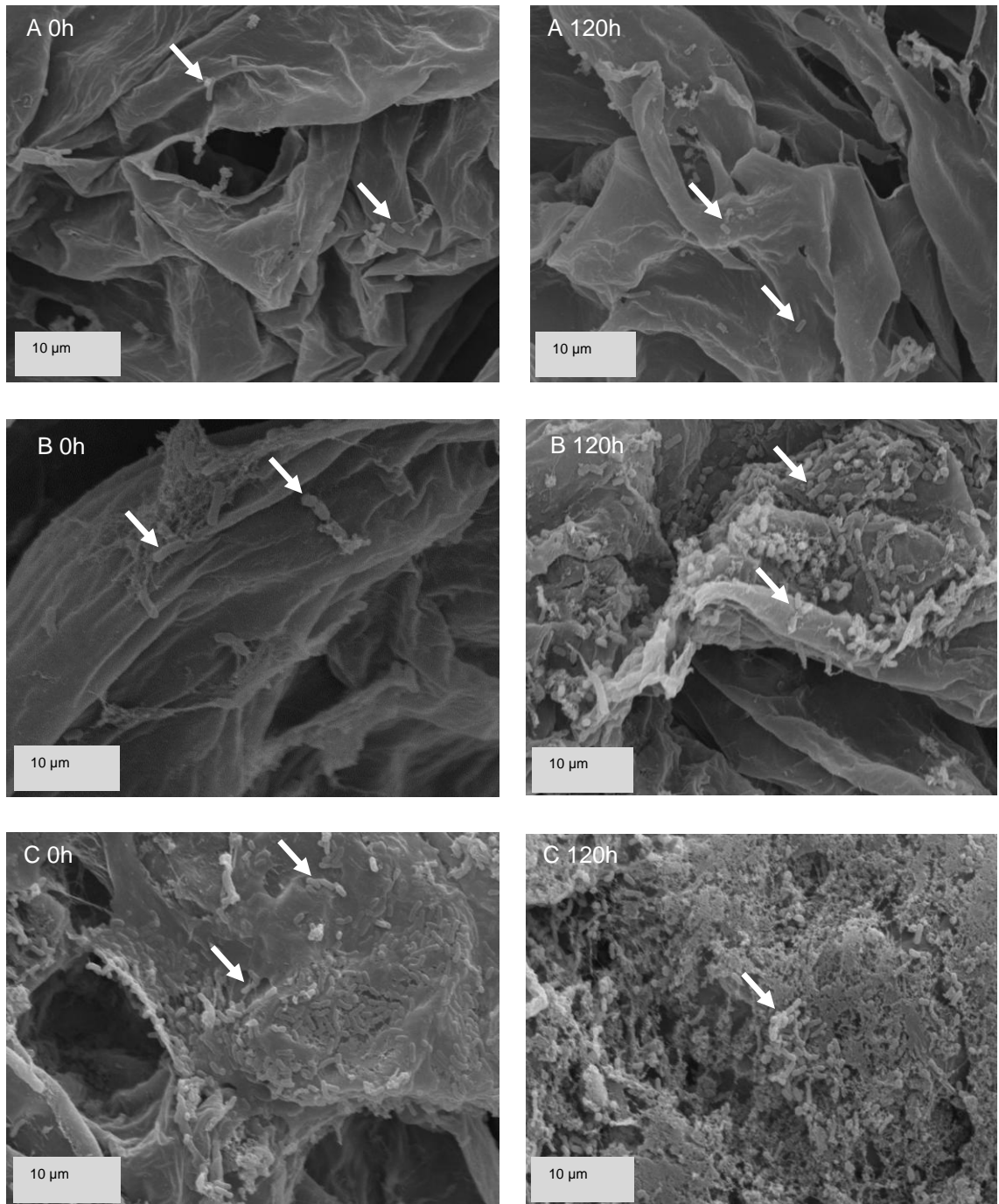


Figura 5 – *L. rhamnosus* aderidos à superfície das frutas abacaxi (A), banana (B), goiaba (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento.

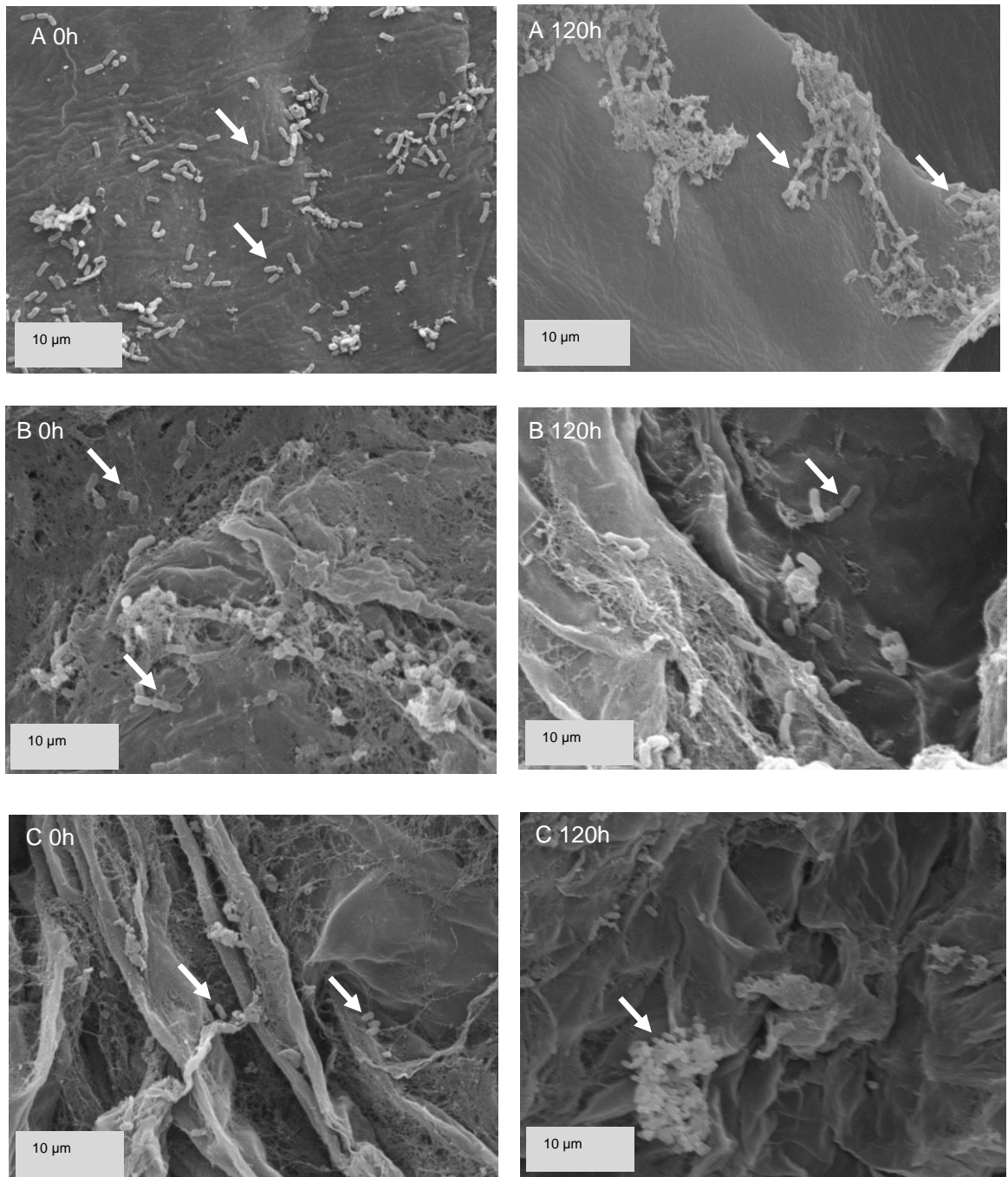


Figura 6 – *L. rhamnosus* aderidos à superfície das frutas maçã (A), mamão (B) e manga (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento.

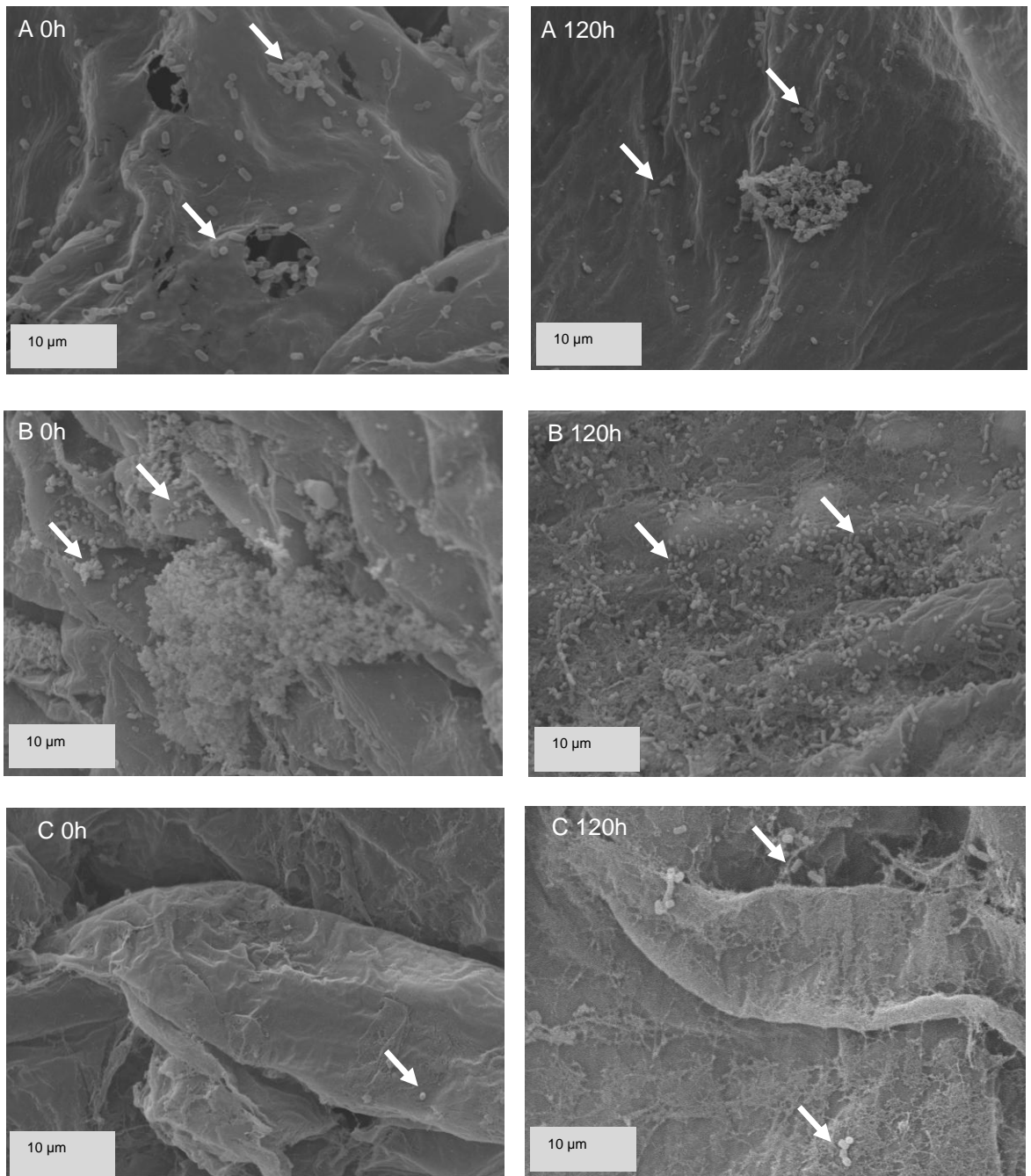


Figura 7 – *L. acidophilus* aderidos à superfície das frutas abacaxi (A), banana (B) e goiaba (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento.

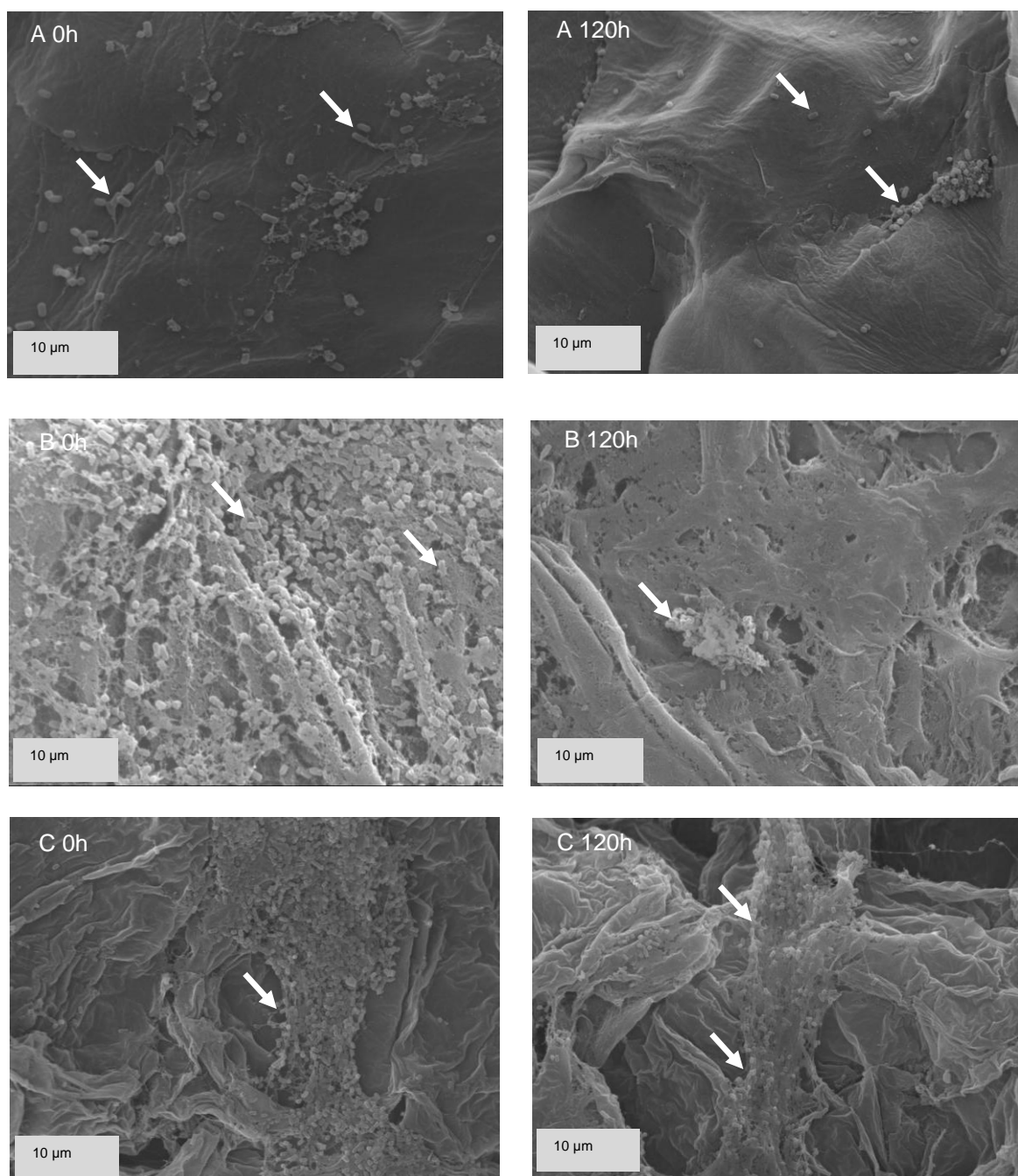


Figura 8 – *L. acidophilus* aderidos à superfície das frutas maçã (A), mamão (B) e manga (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento.

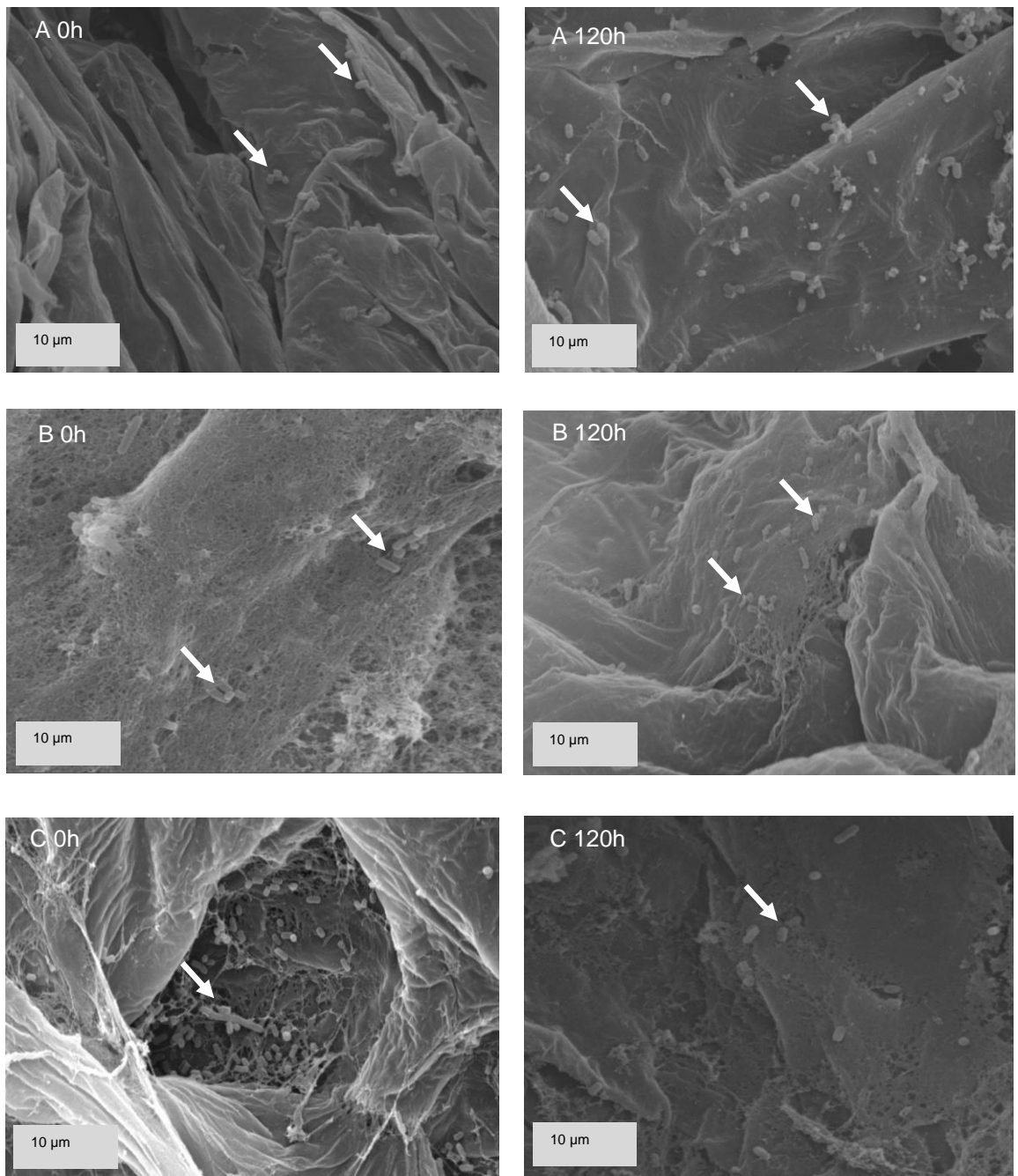


Figura 9 – *L. plantarum* aderidos à superfície das frutas abacaxi (A), banana (B) e goiaba (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento.

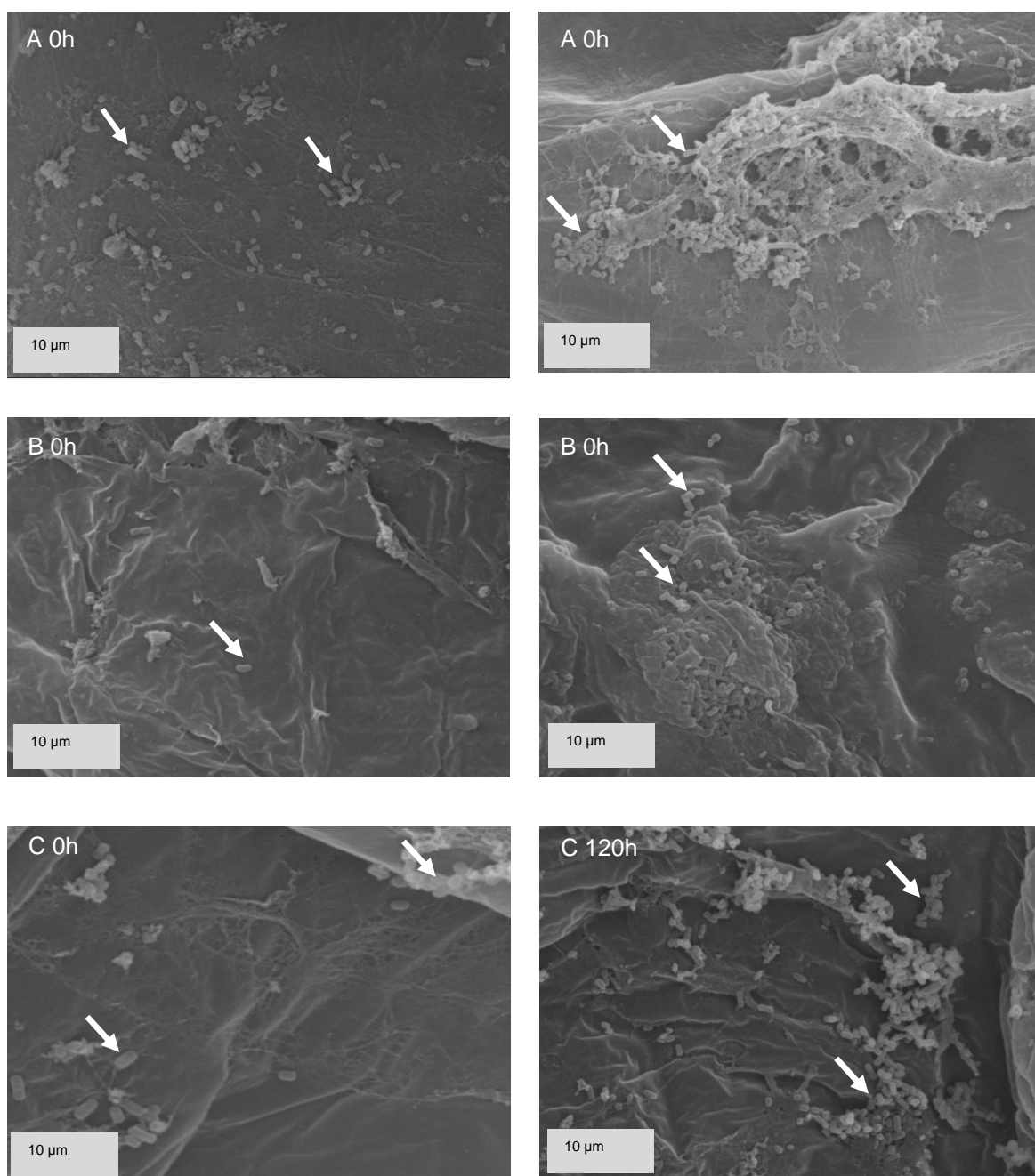


Figura 10 – *L. plantarum* aderidos à superfície das frutas maçã (A), mamão (B) e manga (C) logo após o processamento das saladas (tempo 0) e após 120 horas de armazenamento.

No presente trabalho, a goiaba também se mostrou como uma matriz promissora para veicular *L. rhamnosus* (Figura 5C). Não se observou alto número de células de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* aderidas ao tecido de abacaxi, provavelmente devido as suas características intrínsecas, como pH

e acidez, que podem restringir o crescimento dos micro-organismos. No entanto, o abacaxi é uma fruta bem apreciada pelos consumidores e deve ser utilizada no preparo de saladas de frutas.

Observou-se que o tecido de mamão e manga (Figuras 8B e 8C) foi mais susceptível a adesão de *L. acidophilus*, comparado as outras culturas probióticas usadas neste estudo.

Apesar da incorporação de bactérias probióticas em frutas processadas ser um desafio, é altamente vantajosa, pelo fato dessa categoria de alimentos, rica em nutrientes, ser consumida pela maioria dos indivíduos, sendo bem aceita pelo público (SAAD et al., 2011). Além disso, apesar da escassez de estudos que demonstrem o efeito das frutas como matriz alimentícia na sobrevivência e/ou atividade de micro-organismos probióticos, os estudos realizados até o momento, indicam um efeito neutro e até mesmo positivo sobre a microbiota probiótica e sua interação com o hospedeiro (ESPÍRITO-SANTO et al., 2011).

4.5. Determinação de textura das frutas utilizadas na salada

Constatou-se que a adição das culturas probióticas de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* não promoveu alteração significativa na textura das frutas presentes na salada ($p > 0,05$) em relação às frutas controle (Tabelas 5 e 6). Porém observou-se que a textura de maçã, foi alterada ($p < 0,05$) com a adição de *L. acidophilus*, o que é indesejável, comparado ao tratamento controle (Tabela 7).

Rößle et al. (2010a) verificaram que maçãs do tratamento controle e contendo *L. rhamnosus* GG perderam textura após o segundo dia de armazenamento, diferente do que foi observado no presente estudo, uma vez que *L. rhamnosus* não alterou ($p > 0,05$) a textura de maçã comparado ao controle (Tabela 5) durante o período de armazenamento. No entanto, constatou-se perda de textura desta fruta na salada contendo *L. acidophilus* (Tabela 7) ao longo do tempo ($p < 0,05$).

Tabela 5. Resultados médios (n=12) de firmeza (N) das frutas utilizadas em salada dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus*

| Tratamento | Manga | Mamão | Banana | Goiaba | Maçã | Abacaxi |
|---------------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Controle | 18.36 a | 5.41 a | 16.68 a | 30.53 a | 48.02 a | 19.39 a |
| <i>L. rhamnosus</i> | 16.11 a | 4.80 a | 13.87 a | 25.12 a | 49.83 a | 20.72 a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F ($p > 0.05$).

Tabela 6. Resultados médios (n=12) de firmeza (N) das frutas utilizadas em salada dos tratamentos controle e contendo *L. plantarum*

| Tratamento | Manga | Mamão | Banana | Goiaba | Maçã | Abacaxi |
|---------------------|---------|--------|---------|--------|----------|---------|
| Controle | 10.30 a | 8.55 a | 15.24 a | 59.8 a | 115.20 a | 26.45 a |
| <i>L. plantarum</i> | 16.67 a | 8.04 a | 14.38 a | 68.3 a | 112.21 a | 29.92 a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F ($p > 0.05$).

Tabela 7. Resultados médios (n=12) de firmeza (N) das frutas utilizadas em salada dos tratamentos controle e contendo *L. acidophilus*

| Tratamento | Manga | Mamão | Banana | Goiaba | Maçã | Abacaxi |
|-----------------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Controle | 18.00 a | 5.05 a | 13.15 a | 35.55 a | 71.49 a | 20.15 a |
| <i>L. acidophilus</i> | 22.35 a | 4.55 a | 11.63 a | 24.91 a | 50.41 b | 20.97 a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F ($p > 0.05$).

Após o processamento e ao longo do armazenamento, é esperado que as frutas apresentem redução na sua textura e firmeza, em função de danos ocasionados aos tecidos, que promovem a liberação de água e exsudado. Para as frutas avaliadas, verificou-se que o tempo influenciou ($p < 0,05$) a textura de manga e mamão nas saladas de frutas contendo *L. rhamnosus* (Figura 11). Porém, a textura destas frutas não foi afetada pelos tratamentos e nem pela interação tempo e tratamento. É possível observar a redução da textura destas frutas por meio das médias dos valores de ambos os tratamentos (Figura 11).

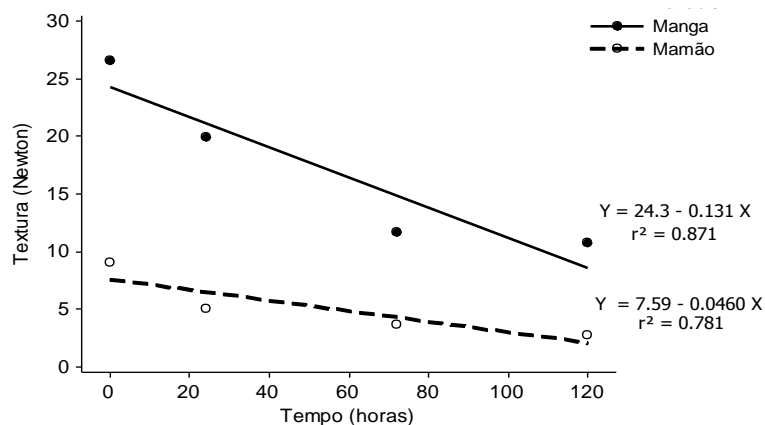


Figura 11. Equação de regressão e coeficiente de determinação de textura de manga e mamão na salada de frutas controle e contendo *L. rhamnosus* em função do tempo de armazenamento.

Verificou-se também que a textura de mamão e banana na salada de frutas contendo *L. plantarum* (Figura 12) foi influenciada pelo tempo de armazenamento ($p < 0,05$), embora os tratamentos não tenham diferido entre si e a interação tempo e tratamento não tenha sido afetada ($p > 0,05$). Portanto, a redução da textura destas frutas foi determinada por meio das médias dos valores de ambos os tratamentos (Figura 12).

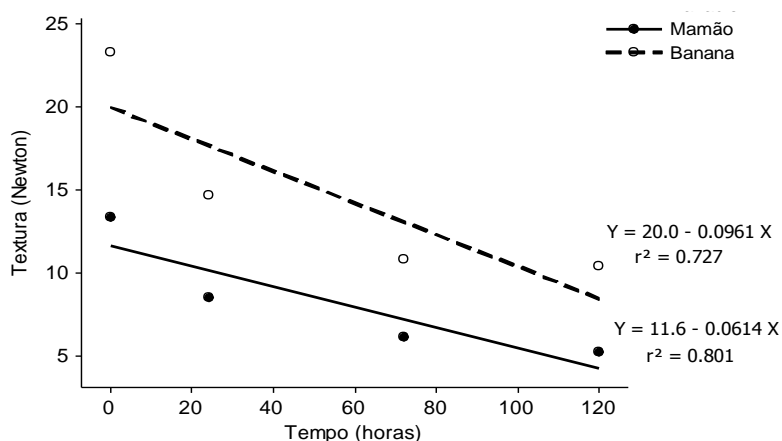


Figura 12. Equação de regressão e coeficiente de determinação de textura de mamão e banana na salada de frutas controle e contendo *L. plantarum* em função do tempo de armazenamento.

Mamão, banana e maçã na salada de frutas contendo *L. acidophilus* (Figura 13) perderam firmeza durante o período de armazenamento ($p < 0,05$). No entanto, somente a textura de maçã (Tabela 7) foi afetada pela adição de *L. acidophilus* ($p < 0,05$). Não se constatou interação significativa ($p > 0,05$) entre o tempo de armazenamento e os tratamentos para estas frutas.

Observou-se que a textura de mamão reduziu ($p < 0,05$) ao longo de 120 horas de armazenamento a 8 °C para todos os tratamentos. Além disso, a textura de banana foi influenciada pelo tempo ($p < 0,05$) nos tratamentos controle e contendo *L. acidophilus* e *L. plantarum*.

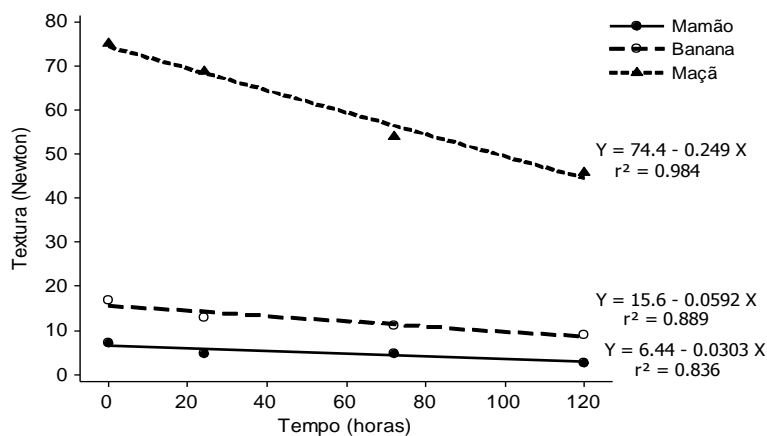


Figura 13. Equação de regressão e coeficiente de determinação de textura de mamão, banana e maçã na salada de frutas controle e contendo *L. acidophilus* em função do tempo de armazenamento.

Frutas climatéricas como mamão, banana e manga apresentam curta vida de prateleira, sendo o mamão uma fruta de elevada perecibilidade. Sañudo-Barajas et al. (2009) estudaram o metabolismo celular e as enzimas envolvidas no processo de amaciamento pós-colheita de mamão e verificaram que no ponto de colheita as frutas apresentaram textura igual a 144N, chegando a 17 N no sexto dia de armazenamento. Já Tapia et al. (2008) verificaram que a textura de mamão minimamente processado foi de aproximadamente 2 N ao longo de oito dias de estocagem a 4 °C. Para os autores, o amaciamento de mamão ocorreu principalmente devido à hidrólise dos ácidos pécnicos nas paredes das células, o que promoveu a perda da firmeza, como observado também no presente estudo.

4.6. Características físico-químicas das saladas de frutas

Verificou-se que a salada de frutas adicionada de *L. rhamnosus* apresentou valores de pH e acidez diferentes das saladas de frutas do tratamento controle ($p < 0,05$) (Tabela 8). A redução do pH e aumento da acidez do produto se deve, provavelmente, à produção de ácidos, uma vez que *L. rhamnosus* é uma bactéria heterofermentativa. É importante considerar que esta cultura apresentou maior viabilidade ($p < 0,05$) nas saladas de frutas probióticas comparada às saladas adicionadas de *L. acidophilus* e *L. plantarum*, o que justifica a alteração de pH e acidez.

Tabela 8. Resultados médios de pH, acidez e teor de sólidos solúveis (°Brix) de saladas de frutas minimamente processadas dos tratamentos controle e contendo bactérias probióticas em diferentes tempos de armazenamento

| Tratamentos | pH | Acidez | Sólidos solúveis (°Brix) |
|-----------------------|--------|----------|--------------------------|
| Controle | 4.15 a | 0.319 b | 11.84 a |
| <i>L. rhamnosus</i> | 3.91 b | 0.461 a | 11.50 a |
| <i>L. acidophilus</i> | 4.11 a | 0.387 ab | 12.08 a |
| <i>L. plantarum</i> | 4.11 a | 0.337b | 12.00 a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tempo não influenciou ($p > 0,05$) o pH, a acidez e o teor de sólidos solúveis das saladas de frutas em nenhum dos tratamentos. No entanto, normalmente, os ácidos orgânicos tendem a diminuir no decorrer do armazenamento, à medida que são utilizados durante a respiração ou convertidos em açúcares, mas por outro lado, a acidez titulável pode aumentar também durante o armazenamento, provavelmente em decorrência do baixo metabolismo respiratório, que gera um acúmulo de ácidos nos vacúolos, à medida que os teores de sólidos solúveis aumentam (ALVES et al., 2010).

Não se constatou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos com relação ao teor de sólidos solúveis das saladas de frutas. Rößle et al. (2010b) também não verificaram alteração deste parâmetro em maçãs minimamente processadas inoculadas com *L. rhamnosus* GG e mantidas a 2 e 4 °C por 14 dias. Resultados similares também foram relatados por Melo;

Vilas-Boas; Justo (2009) no qual não foi observado variação significativa em banana maçã minimamente processada no tempo zero (logo após o processamento) comparado ao quarto dia de estocagem a 5 °C.

4.6.1. Vitamina C e carotenóides totais das saladas de frutas

Verificou-se que a salada de frutas contendo *L. rhamnosus* apresentou maior teor de vitamina C ($p < 0,05$) comparada ao tratamento controle, até as 72 horas de armazenamento (Tabela 9). O maior teor de vitamina C nas saladas contendo *L. rhamnosus* se deve ao fato das frutas deste tratamento serem imersas em solução de ácido ascórbico 1 % para minimizar o escurecimento enzimático, o que promoveu o enriquecimento do produto, comparado ao controle. Além disso, observou-se acentuada redução do teor de vitamina C na salada de frutas contendo ácido ascórbico 1 %, em função deste composto estar livre no produto e não presente naturalmente, como na salada de frutas do tratamento controle, onde se constatou menor redução.

Tabela 9. Resultados médios de vitamina C (mg/100g) nas saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus*, ao longo do período de estocagem a 8 °C

| Tratamentos | 0 h | 48 h | 72 h | 120 h |
|--------------------|----------|---------|---------|---------|
| Controle | 29,88 b | 13,06 b | 12,93 b | 10,71 a |
| <i>L.rhamnosus</i> | 109,22 a | 37,99 a | 26,43 a | 13,14 a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitamina C varia conforme a idade e condições de saúde. De acordo com a RDC n.º 269 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a recomendação de ingestão de vitamina C é de 45 mg/dia (BRASIL, 2005). Assim, considerando a legislação brasileira e os resultados obtidos, basta ingerir 200g de salada de frutas controle ou 100g de salada contendo a cultura probiótica, logo após o processamento, para adquirir a quantidade diária necessária de vitamina C. Já segundo Otten; Hellwig; Meyers (2006), do guia de absorção dietética de referência dos Estados Unidos, a recomendação diária de vitamina C para a

população masculina e feminina, com idade acima de 18 anos, é de 90 mg e 75 mg, respectivamente.

Além de haver diferença do teor de vitamina C entre as saladas de frutas controle e contendo *L. rhamnosus*, constatou-se também efeito significativo do tempo de armazenamento ($p < 0,05$) e da interação dos fatores tratamento e tempo ($p < 0,05$) sobre o teor de ácido ascórbico. Dessa forma, ajustou-se um modelo de regressão em função do tempo em cada tratamento (Figura 14).

Assim, verificou-se um declínio do teor de vitamina C das saladas de frutas de ambos os tratamentos em função do tempo de estocagem (Figura 14), o que está de acordo com dados da literatura.

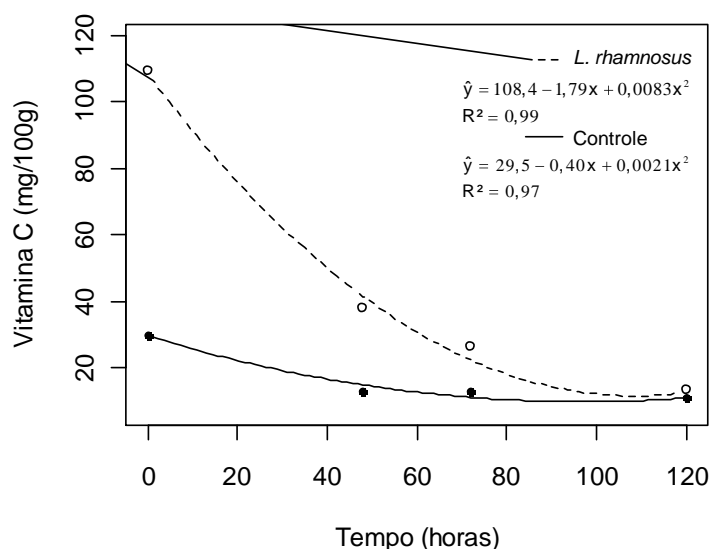


Figura 14. Equação de regressão e coeficiente de determinação de vitamina C em função do tempo de armazenamento de saladas de frutas controle e contendo *L. rhamnosus*.

Segundo Beaulieu (2011), o conteúdo de vitamina C geralmente reduz após o processamento e tende a diminuir com o armazenamento, pois os danos mecânicos causados pelo processamento mínimo nos tecidos vegetais promovem a desorganização celular ocasionando a oxidação do ácido ascórbico à ácido dehidroascórbico, em razão da atuação direta da enzima ácido ascórbico oxidase, ou pela ação de enzimas oxidantes como a

peroxidase (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O processamento mínimo resulta também em um aumento na atividade respiratória e na produção de etileno que, quando associados, aumentam as taxas de outras reações bioquímicas responsáveis por mudanças de cor, odor, textura e qualidade nutricional das frutas. Essas alterações representam um impacto sobre os compostos fotoquímicos e sobre as propriedades antioxidantes, sendo esta última atribuída a componentes bioativos tais como vitamina C e carotenóides, que são benéficos à saúde e estão presentes no fruto intacto (ROBLES-SANCHEZ et al., 2007).

Neste estudo não se observou degradação significativa no teor de carotenóides ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento entre as saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus* (Tabela 10).

Tabela 10. Médias (n=8) de carotenóides totais de saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus* logo após o processamento (tempo 0 h) e após 120 h a 8 °C

| Conteúdo de carotenóides totais (mg/g) | | |
|--|-------|-------|
| Tratamentos | 0 h | 120 h |
| Controle | 0,01a | 0,01a |
| <i>L. rhamnosus</i> | 0,01a | 0,01a |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Rodriguez-Amaya; Kimura; Amaya-Farfan (2008) relataram que os alimentos que contêm mais de 0,02 mg/g de carotenóides são fontes ricas deste pigmento, importante para a saúde. De acordo com De-Ancos et al. (2011), não existe recomendação para consumo diário de carotenóides, mas estudos sugerem a ingestão de 5 a 6 mg diariamente. Dessa forma, com base nesta informação, o consumo de 100 g de saladas de frutas elaborada no presente estudo oferece ao consumidor 1 mg de carotenóides totais, sendo considerada boa fonte deste composto benéfico ao organismo.

Resultados similares foram observados por Djioua et al. (2009), que encontraram aproximadamente 1 mg/100g de carotenóides em manga

minimamente processadas armazenadas a 6 °C por seis dias, valor semelhante ao encontrado nas saladas de frutas do presente estudo.

4.7. Características microbiológicas das saladas de frutas

A qualidade e a segurança dos produtos minimamente processados dependem da adoção das boas práticas agrícolas e das boas práticas de fabricação durante todas as etapas de processamento, sobretudo das condições higiênicas dos manipuladores e da temperatura de estocagem. Na Tabela 11 esta apresentada a qualidade microbiológica das saladas de frutas elaboradas. Verificou-se baixa contagem de micro-organismos psicotróficos nos tratamentos controle e adicionados de bactérias probióticas logo após o processamento. No entanto, ao longo do tempo, constatou-se aumento desta microbiota, principalmente na salada de frutas controle comparada àquelas contendo *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*. Assim, as saladas de frutas contendo estas culturas probióticas apresentaram contagens de micro-organismos psicotróficos de, no mínimo, 2,0 Log UFC/g inferiores em relação às saladas controle após 120 horas de armazenamento a 8 °C (Tabela 11).

O efeito de *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* sobre a redução da contagem de psicotróficos e de *L. acidophilus* e *L. plantarum* sobre a redução do número mais provável de coliformes a 30 °C nas saladas de frutas armazenadas por até 120 horas deve-se, provavelmente, à biopreservação, uma vez que estas culturas além de produzirem ácidos que promovem a redução do pH do meio, criando condições desfavoráveis ao crescimento microbiano, produzem peptídeos antimicrobianos que podem inibir ou inativar o desenvolvimento de bactérias indesejáveis em alimentos. Segundo Trias et al. (2008), as bactérias lácticas podem atuar como competidoras e antagonistas da microbiota deterioradora e patogênica em frutas minimamente processadas, mantendo a segurança e a vida útil desses produtos.

Tabela 11. Média da contagem (n=3) de micro-organismos psicotróficos (Log UFC/g), do número mais provável de coliformes a 30 °C e a 45 °C (NMP/g) e análise de *Salmonella* em saladas de frutas controle e contendo culturas probióticas

| Tratamentos | Tempo 0 h | | | | Tempo 120 h | | | |
|-----------------------|---------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| | Psicotróficos | Coliformes 30 °C | Coliformes 45 °C | <i>Salmonella</i> | Psicotróficos | Coliformes 30 °C | Coliformes 45 °C | <i>Salmonella</i> |
| Controle | 2,6 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência | 5,1 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência |
| <i>L. rhamnosus</i> | 2,5 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência | 2,9 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência |
| Controle | < 1,0 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência | 4,0 | 12,1 | < 3,0 | Ausência |
| <i>L. acidophilus</i> | < 1,0 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência | < 1,0 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência |
| Controle | 2,4 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência | 2,7 | 6,7 | < 3,0 | Ausência |
| <i>L. plantarum</i> | 2,2 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência | 2,2 | < 3,0 | < 3,0 | Ausência |

Estirpes de *L. rhamnosus* produzem peptídeos antimicrobianos que inibem *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Typhi, *Shigella* sp., *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, entre outros micro-organismos (PITHVA et al., 2011). Alegre et al. (2011) avaliaram a adição de *L. rhamnosus* GG em maçã minimamente processada e seu efeito sobre o crescimento de patógenos como *L. monocytogenes* e *Salmonella* de diferentes estirpes e constataram que a contagem de *L. monocytogenes* reduziu 1,00 ciclo Log nas maçãs inoculadas com a cultura probiótica.

A salada de frutas elaborada no presente trabalho atendeu aos padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC n.º 12 da Anvisa (BRASIL, 2001), para hortaliças e frutas frescas, *in natura*, preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para o consumo direto, uma vez que esta legislação preconiza até 10² NMP/g para coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella* em 25 g do produto. Dessa forma, a salada de frutas encontrava-se apta para consumo até 120 horas após o processamento.

Oliveira et al. (2011) verificaram elevadas populações de micro-organismos psicrotróficos, acima de 7,1 Log UFC/g em amostras de vegetais minimamente processados comercializados na região Sudeste do Brasil, o que sugere a curta vida de prateleira, bem como a pobre qualidade higiênico sanitária do produto. Os autores observaram também que 85 % das amostras avaliadas continham acima de 3,0 log NMP/g de coliformes totais e 69,2 % continham acima de 2,0 log NMP/g de coliformes termotolerantes, sendo que *Salmonella* estava presente em duas amostras avaliadas, diferente dos resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que foram adotadas as boas práticas de fabricação nas etapas de processamento mínimo das saladas de frutas.

4.8. Aceitabilidade sensorial das saladas de frutas

A análise sensorial foi realizada após o processamento e no final da vida de prateleira das saladas para verificar se haveria diferença na

aceitação das amostras pelos consumidores. Os resultados de aceitabilidade sugerem que as saladas de frutas de ambos os tratamentos foram bem aceitas, uma vez que as notas encontram-se acima de 7,0, gostei moderadamente, na escala hedônica de nove pontos para os atributos avaliados (Tabela 12), não havendo diferença ($p > 0,05$) entre a salada de fruta do tratamento controle e a adicionada de *L. rhamnosus*.

Tabela 12. Médias dos atributos cor, sabor e impressão global de saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus* logo após o processamento (tempo 0 h) e após 120 h de armazenamento a 8 °C

| Amostras | Cor | | | Sabor | | | Impressão Global | | |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| | Tempo | | | Tempo | | | Tempo | | |
| | 0 h | 120h | Média | 0 h | 120 h | Média | 0 h | 120 h | Média |
| Controle | 8.04 | 7.22 | 7.63a | 7.90 | 7.16 | 7.53a | 8.00 | 7.32 | 7.66a |
| <i>L. rhamnosus</i> | 7.58 | 7.26 | 7.42a | 7.50 | 7.26 | 7.38a | 7.68 | 7.30 | 7.49a |
| Média | 7.81A | 7.24B | | 7.70A | 7.21B | | 7.84A | 7.31B | |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, respectivamente, não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

Verificou-se que a adição de *L. rhamnosus* não promoveu alteração na aceitação das saladas de frutas, comparado ao controle, para os atributos cor, sabor e impressão global ($p > 0,05$), após o processamento. No entanto, constatou-se impacto significativo do tempo sobre os atributos avaliados ($p < 0,05$). Rößle et al. (2010a) avaliaram a aceitabilidade de maçãs minimamente processadas enriquecidas com cultura probiótica e também verificaram que o produto foi bem aceito pelos provadores.

5. CONCLUSÕES

Ácido ascórbico e cloridrato de cisteína foram mais efetivos em retardar o escurecimento das saladas de frutas. O ácido ascórbico foi selecionado como melhor agente inibidor do escurecimento das saladas, por ser de menor custo e contribuir para enriquecer o conteúdo de vitamina C das saladas, além de ser um produto inócuo e natural.

As saladas de frutas escureceram ao longo do período de armazenamento a 8 °C, o que foi constatado pela redução dos valores de L*. Por outro lado, os valores de a*, c*, ângulo h° e IC indicaram predominância de cores vívidas nas saladas de frutas, com tendência à cor vermelha.

Os agentes inibidores de escurecimento não promoveram impacto negativo sobre a viabilidade de *L. acidophilus*.

As saladas de frutas minimamente processadas contendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum* podem ser consideradas veículos de bactérias probióticas por até 120 horas de armazenamento a 8 °C, uma vez que os resultados de viabilidade encontrados foram semelhantes aos verificados para produtos lácteos disponíveis no mercado e podem ser consumidas por indivíduos vegetarianos, crianças, idosos e indivíduos que possuem restrição de colesterol na dieta.

As frutas banana, maçã, goiaba, mamão e manga apresentaram-se como uma matriz promissora para veicular as culturas probióticas. Abacaxi não se mostrou uma boa matriz para veicular *L. rhamnosus* e *L. plantarum* em função do baixo número de células aderidos ao tecido.

Houve uma excelente adesão e distribuição dos micro-organismos em banana, maçã e goiaba, provavelmente devido à estrutura interna de seus tecidos.

A seleção de uma matriz vegetal capaz de veicular micro-organismos probióticos viáveis é importante. No entanto, torna-se essencial a avaliação do produto contendo estas bactérias probióticas estudadas por meio de ensaios clínicos a fim de verificar a adesão e a permanência das mesmas ao intestino. Muitos estudos *in vitro* têm sido realizados, entretanto, poucos ensaios clínicos *in vivo* foram conduzidos.

As frutas presentes nas saladas não apresentaram alteração de textura em função da adição de *L. rhamnosus* e *L. plantarum*.

Manga e mamão nas saladas contendo *L. rhamnosus*, mamão, banana e maçã nas saladas contendo *L. acidophilus* e mamão e banana nas saladas contendo *L. plantarum* tiveram suas texturas influenciadas pelo tempo, tornando-se mais macias no final da vida de prateleira.

As saladas de frutas contendo *L. rhamnosus* apresentaram alteração de pH e acidez, mas esta alteração não causou impacto negativo sobre a aceitabilidade do produto.

Houve redução significativa do teor de vitamina C das saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus*, em função do tempo de armazenamento.

Não houve degradação significativa do conteúdo de carotenóides totais das saladas ao longo do período de estocagem.

As saladas de frutas elaboradas atenderam aos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira e são consideradas seguras para consumo humano.

As saladas de frutas dos tratamentos controle e contendo *L. rhamnosus* foram bem aceitas pelos consumidores, estando entre gostei moderadamente e gostei muito na escala hedônica, sendo um produto promissor para o mercado, com apelo dos benefícios promovidos pelos micro-organismos probióticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE, I.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, v. 28, p. 59-66, 2011.
- 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. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 714-721, maio/jun., 2010.
- ALZAMORA, S.M.; SALVATORI, D.; TAPIA, M.S.; LÓPEZ-MALO, A.; WELTI-CHANES, J.; FITO, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 205–214, 2005.
- ANDREWS, W.H.; FLOWER, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p.357-380, 2001.
- ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Lactic Acid Bacteria/*Lactobacillus* spp.: General Characteristics. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 78-90, 2011.
- ANKOLEKAR, C.; PINTO, M.; GREENE, D.; SHETTY, K. *In vitro* bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of *Lactobacillus acidophilus* fermented pear juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 221-230, 2012.
- ARAYA, H.; LUTZ, M.R. Alimentos funcionales y saludables. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 30, p. 8-14, 2003.
- ARVANITOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 385-404, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA das INDÚSTRIAS de REFRIGERANTES e de BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS - ABIR. Mercado de sucos/néctares de frutas. In: **Hortifruti-Brasil**, ano 8, n. 81, Julho/2009.
- BALDWIN, E.A.; BAI, J. Physiology of Fresh-Cut Fruits and Vegetables. In: MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. (Eds.). **Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing**. London, New York, CRC Press, 2011. Cap. 4, p. 87-113.

BEAULIEU, J.C. Factors Affecting Sensory Quality of Fresh-Cut Produce. In: Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. (Eds.). **Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing**. London, New York, CRC Press, 2011. p. 115-143.

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.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.J.; PAGÁN, M.J.; GARCÍA, M.J.; GRAS, M.L.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Development of probiotic enriched dried fruits by vacuum impregnation. **Journal of Food Engineering**, v.56, p. 273–277, 2003.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n.2/3, p. 125-131, 2002.

BONOMO, R.C.F.; CARNEIRO, J.C. de S.; BATISTA, S.A.; PIRAJÁ, D.C.R.; FONTAN, R. da C. I.; CARVALHO, B.M.A. de; COSTA, A.M.G.; Da SILVA, A.A.L. Desenvolvimento e avaliação sensorial de um “mix” de polpa congelada à base de cajá (*Spondias mombim* L.) e graviola (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.8, n.1, p.11-15, 2006.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. 2005. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2005.

BRACKETT, R.E.; SPLITTSTOESSER, D.F. Fruits and Vegetables. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association – APHA, 2001. Cap 50, p. 515-520.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas – Atualizada em julho/2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 16 dez. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 dez. 1999.

BURITY, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, p. 373-380, 2007.

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**, n.29, 2007.

CARNELOSSI, M.A.G. Saladas mistas minimamente processadas: desafios, tendências e perspectivas. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. VI, 2011. Caderno do Congressita, Nova Friburgo, RJ: Editora Tecart, 26 a 28 de outubro de 2011. p. 41-42.

CARVALHO, A.F.; MORAES, C.A.; LEANDRO, E.S.; ARAÚJO, E.A. Universidade Federal de Viçosa. Produção de queijo tipo Cottage probiótico. PI0701749-9. 18 maio 2007, 06 jan. 2009. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. 6p.

ÇETIN, B. Production of probiotic mixed pickles (Turşu) and microbiological properties. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 14926-14931, 2011.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, p. 539–543, 2008.

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

CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 185–193, 2011.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S.S. Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, p. 431–435, 2010.

CHAVES, K.F.; CRUZ, W.F.; MARTINS, E.M.F.; MARTINS, M.L. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* em yacon minimamente processado e avaliação de suas características físico-químicas e microbiológicas. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas - Hortaliças, VI, 2011, Nova Friburgo, R.J. **Anais...** Nova Friburgo, 26 a 28 de outubro, 2011. CD-ROM.

CHEN, A.; MUSTAPHA, A. Survival of freeze-dried microcapsules of a-galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. **Food Microbiology**, v. 30, p. 68-73, 2012.

CHEN, T.R.; WEI, Q.K.; CHI, Z.X. Effect of oligosaccharides and isoflavones aglycones in defatted soy meal fermented by *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium longum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 2011-2018, 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005, 783 p.

CLERICI, M.T.P.S.; STEEL, C.J.; CHANG, Y.K. Produtos Probióticos a Base de Cereais. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. (Eds.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. Cap.21, p. 503-540.

CODA, R.; LANERA, A.; TRANI, A.; GOBBETTI, M.; DICAGNO, R. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. **International Journal of Food Microbiology**, 2012, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.016

CRUZ, W.F.; CHAVES, K.F.; MARTINS, E.M.F.; MARTINS, M.L. Alfaca minimamente processada enriquecida com *Lactobacillus paracasei*. In: Simpósio de Ciência, Inovação e Tecnologia, 3., 2010, Rio Pomba, 2010. CD-ROM.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effectiveness of Ascorbic Acid as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 435-443, 1997a.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of Cysteine on the Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p.537-545, 1997b.

DE-ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; CANO, M. P. Nutritional and Health Aspects of Fresh-Cut Vegetables. In: Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. (Eds.). **Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing**. London, New York, CRC Press, 2011. p. 145-184.

DE-BELLIS, P.; VALERIO, F.; SISTO, A.; LONIGRO, S.L.; Lavermicocca, P. Probiotic table olives: Microbial populations adhering on olives surface in

fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in a industrial plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 6–13, 2010.

DJIOUA, T.; CHARLES, F.; LOPEZ-LAURI, F.; FILGUEIRAS, H.; COUDRETA, A.; FREIRE Jr., M.; DUCAMP-COLLIN, M.N.; SALLANON, H. Improving the storage of minimally processed mangoes (*Mangifera indica* L.) by hot water treatments. **Post harvest Biology and Technology**, v. 52, p. 221-226, 2009.

ELLENDERSEN, L.S.N.; GRANATO, D.; GUERGOLETTA, K.B.; WOSIACKI, G. Probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*: development and sensory profile. **Engineering in Life Sciences**. doi: 10.1002/elsc.201100136, 2012.

ESPÍRITO-SANTO, A.P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.O. Influence of food matrices on probiotic viability – A review focusing on the fruity bases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 377-385, 2011.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Preliminary Data Now Available for Selected Countries and Products. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 28 jun. 2012.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FERNANDES, C.M.; SILVA, F.J.M.; LIMA, D.C.N.; MARTINS, E.M.F.; MARTINS, M.L. Qualidade físico-química e viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* em couve minimamente processada. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas - Hortaliças, VI, 2011, Nova Friburgo, R.J. **Anais...** Nova Friburgo, 26 a 28 de outubro, 2011. CD-ROM.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas – Caracterização e Aplicação Tecnológica de Bactérias Probióticas. In: **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: UFV, p. 07-33, 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 112p.

FERREIRA, C. L. L. F.; SILVA, A.C. Probióticos e Prebióticos na Saúde da Criança. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. (Eds.). **Alimentos Funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. Cap. 6, p. 97-110.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: What are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 711-724, 2003.

FONTELES, T.V.; COSTA, M.G.M.; JESUS, A.L.T. de; RODRIGUES, S. Optimization of the fermentation of cataloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0600-0.

FONTES, L. C. B.; SARMENTO, S. B. S.; SPOTO, M. H. L. Características sensoriais e microbiológicas de maçãs minimamente processadas recobertas com películas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p. 912-98, 2007.

FONTES, L. C. B.; SARMENTO, S. B. S.; SPOTO, M. H. L.; DIAS, C. T. S. Conservação de maçã minimamente processada com uso de película comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p. 872-880, 2008.

FOOD PROCESSING. Modest growth for global probiotic market, 2009. Disponível em: <<http://www.foodprocessing.com/articles/2008/383.html>>. Acesso em 20 jan. 2012.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar: Boletim de Tecnologia**, v. 101, p. 12–22. 2002.

GUTIERREZ, J.; BOURKE, P.; LONCHAMP, J.; BARRY-RYAN, C. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, p. 195-202, 2009.

HERNADES, N.K.; CONEGLIAN, R.C.C.; GODOY, R.L.O.; VITAL, H.C.; FREIRE JUNIOR, M. Testes sensoriais de aceitação da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* L.), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 64-68, 2007.

HURTADO, A.; REGUANT, C.; BORDONS, A.; ROZÉS, N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. **Food Microbiology**, v. 31, p. 1-8, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Culturas temporárias e permanentes, v. 37, 2010. 91p.

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

JAUQUET, M.; ROCHAT, I.; MOULIN, J.; CAVIN, C.; BIBILONI, R. Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 117–121, 2009.

JESUS, M.M.S. de; CARNELOSSI, M.A.G.; SANTOS, S.F.; NARAIN, N.; CASTRO, A.A. Inibição do escurecimento enzimático de quiabo minimamente processado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 4, p. 524-530, out-dez, 2008.

JONES, J.P.; VARADY, K.A. Are functional foods redefining nutritional requirements? **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 33, p. 118-123, 2008.

JOOD, S.; KHETARPAUL, N.; GOYAL, R. Efficacy of barley based probiotic food mixture in treatment of pathogenic *E.coli* induced diarrhoea in mice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 200-206, 2012.

KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: University of California, 2002, 535p.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, p. 1317-1322, 2008.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C. A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, jul./set. 2008.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. 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. 69-82, 2001.

KOURKOUTAS, Y.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A.A. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, p. 980–986, 2006.

LEE, H.; YOON, H.; JI, Y.; KIM, H.; PARK, H.; LEE, J.; SHIN, H.; HOLZAPFEL, W. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 155-161, 2011b.

LEE, S.Y.; GANESAN, P.; AHN, J.; KWAK, H.S. *Lactobacillus acidophilus* fermented yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) and its preventive effects on gastric lesion. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, p. 927-932, 2011a.

- LIMA, D.C.N.; OLIVEIRA, M.M.; MARTINS, E.M.F.; MARTINS, M.L. Avaliação da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em cenoura minimamente processada cultivada em sistema agroecológico. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia de Alimentos, 25., 2009, Porto de Galinhas, PE, 8 a 12 de novembro, 2009.
- LIN, C.K.; TSAI, H.C.; LIN, P.P.; TSEN, H.Y.; TSAI, C.C. *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. **Anaerobe**, v. 14, p. 251-255, 2008.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJEON, C. B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p. 1-17, 2001.
- MAHAWAR, M.; SINGH, A.; JALGAONKAR, K. Utility of apple pomace as a substrate for various products: A review. **Food and Bioproducts Processing**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.007>.
- MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. **Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing**. London, New York, CRC Press, 2011. 386p.
- MARTINS, E.M.F.; FERNANDES, C.M.; MARTINS, M.L.; RAMOS, A.M. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em salada de fruta minimamente processada adicionada de diferentes antioxidantes. In: Congresso Brasileiro de Processamento de Frutas e Hortaliças: Alimentação Inteligente com Tecnologia Limpa, 2., 2011, Rio de Janeiro, R.J. **Anais...** Rio de Janeiro, 14 a 17 de agosto, 2011a. CD-ROM.
- MARTINS, E.M.F.; GOMES, W.O.; RAMOS, A.M. Salada de fruta minimamente processada enriquecida com cultura probiótica de *Lactobacillus rhamnosus*. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas - Hortaliças, 6., 2011, Nova Friburgo, R.J. **Anais...** Nova Friburgo, 26 a 28 de outubro, 2011b. CD-ROM.
- MAZZUZ, C.F. **Calidad de frutos citricos: manual para su gestion desde la recoleccion hasta la expedicion**. Barcelona: Ediciones de Horticultura, S.L., 1996. 317p.
- McGUIRE, R.G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, Alexandria, v.27, p.1254-1255, 1992.
- MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, V. B. Inibição do Escurecimento enzimático de Banana Maçã Minimamente Processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.110-115, 2006.
- MELO, A.A.M.; VILAS-BOAS, E.V. de B.; JUSTO, C.F. Uso de aditivos químicos para a conservação pós-colheita de banana 'maçã' minimamente processada. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 228-236, jan./fev., 2009.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: UFV. 2006.

MITSOU, E.K.; KOUGIA, E.; NOMIKOS, Tz.; YANNAKOULIA, M.; MOUNTZOURIS, K.C.; KYRIACOU, A. Effect of banana consumption on faecal microbiota: A randomised, controlled trial. **Anaerobe**, v. 17, p. 384-387, 2011.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, 2006.

MORETTI, C. L. Panorama do processamento mínimo de frutas e hortaliças. In: MORETTI, C. L. (Ed.). **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2007. Cap. 1, p.27-40.

MOUSAVI, Z.E.; MOUSAVI, S.M.; RAZAVI, S.H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.27, p.123-128, 2011.

NESTLÉ. Nestlé lança no Brasil exclusivo cereal infantil com probiótico. São Paulo, set. 2011. Corporativo Nestlé. Disponível em: <<http://corporativo.nestle.com.br/media/pressreleases/Pages/Nestle%20AnoBrasilexclusivocerealinfantilcomprobiotico.aspx>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

NICOLESCO, C.L.; BURULEANU, L.C. Correlation of Some Substrate Parameters in Growing *Lactobacillus acidophilus* on Vegetable and Fruit Cocktail Juices. **Bulletin UASVM Agriculture**, v. 67, 2010.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 111–117, 2011.

OLIVEIRA, M.A. de; SOUZA, V.M. de; BERGAMINI, A.M.M.; MARTINS, E.C.P. de. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400-1403, 2011.

OLIVEIRA, P.M.; LEITE JÚNIOR B. R. C; MARTINS, E.M.F.; MARTINS, M.L.; RAMOS, A.M. Avaliação da viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* em melão minimamente processado. In: Congresso Brasileiro de Processamento de Frutas e Hortaliças: Alimentação Inteligente com Tecnologia Limpa, II, 2011, Rio de Janeiro, R.J. **Anais...** Rio de Janeiro, 14 a 17 de agosto, 2011. CD-ROM.

OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R. Future Trends in Fresh-Cut Fruit and Vegetable Processing. In: Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. (Eds.). **Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing**. London, New York, CRC Press, 2011. p. 377-386.

OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. Washington, DC: Institute of Medicine, 2006. p. 167-285.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WELTICHANES, J.; SWANSON, B. G. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. **Journal of Food Science**, v.64, p.42-45, 1999.

PEREIRA, A.L.F.; MACIEL, T.C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, p. 1276-1283, 2011.

PERES, C.M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F.X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, 2012, doi:10.1016/j.tifs.2012.01.0062012.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOELIICKE, A.P.B. **Alimentos funcionais**. São Paulo: Varela, 2005. 100p.

PITHVA, S.; AMBALAM, P.; DAVE, J. M.; VYAS, B.R.M. Antimicrobial Peptides of Probiotic *Lactobacillus* strains. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. 2011, p.987-991.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. V. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 97–103, 2010.

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.

RAGAERT, P.; JACXSENS, L.; VANDEKINDEREN, I.; BAERT, L.; DEVLIEGHERE, F. Microbiological and Safety Aspects of Fresh-Cut Fruits and Vegetables. In: MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. (Eds.). **Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing**. London, New York, CRC Press, 2011. Cap. 3, p. 53-86.

RAJKOWSKI, K.T.; BALDWIN, E.A. Concerns with Minimal Processing in Apple, Citrus, and Vegetable Products. In: NOVAK, J.S.; SAPERS, G.M.; JUNEJA, V.K. **Microbial Safety of Minimally Processed Foods**. London, New York, CRC Press, 2003. p.35-52.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; SCIFÒ, G. O.; CAGGIA, C. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. **Food Control**, v. 20, p. 756–763, 2009.

RATHORE; S.; SALMERÓN, I.; PANDIELLA, S.S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. **Food Microbiology**, v. 30, p. 239-244, 2012.

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

ROBLES-SANCHEZ, M.; GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O. Minimal processing of tropical fruits: antioxidant potential and its impact on human health. **Food Chemistry**, v.32, n.4, p.227-232, 2007.

RODGERS, S. Incorporation of probiotics in food service products: an exploratory study. **Journal of Foodservice**, v. 18, p. 108-118, 2007.

RODGERS, S. Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 188–197, 2008.

RODRIGUES-AMAYA, D.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington, D.C., p. 41-45, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenóides - Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; GARNER, E.; MARTÍN-BELLOSO, O. **The Fresh-Cut Fruit and Vegetables Industry: Current Situation and Market Trends**. In: MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. (Eds). *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*. London, New York, CRC Press, 2011, Cap. 1, p. 1-12.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 438-447, 2009.

ROSA, C.O.B.; COSTA, N.M.B. Alimentos Funcionais: Histórico, Conceitos e Atributos. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. (Eds.). **Alimentos Funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. Cap. 1, p. 03-08.

ROSADO, P. L.; PIRES, M. M.; PEREZ, R. Frutas processadas sob a forma de salada: preferências dos consumidores e suas implicações no mercado. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, XLVI, Rio Branco – Acre, 2008. **Anais...** Rio Branco – Acre, 20 a 23 de julho de 2008.

RÖßLE, C.; AUTY, M.A.E.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R.T.; BUTLER, F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 11, p. 203-209, 2010a.

RÖßLE, C.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R.T.; ROSS, P.R.; BUTLER, F. Development of potentially symbiotic fresh-cut apple slices. *Journal of Functional Foods*, v.2, p. 245-254, 2010b.

RÖßLE, C.; GORMLEY, R.T.; BUTLER, F. Efficacy of Natureseal® AS1 browning inhibitor in fresh-cut fruit salads applications, with emphasis on apple wedges. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, p. 62-67, 2009.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, jan./mar., 2006.

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. Benefícios à Saúde dos Probióticos e Prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. (Eds.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. Cap. 2, p. 51-84.

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURITI, F.C.A. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Aspectos Tecnológicos, Legislação e Segurança no Uso. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. (Eds.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. Cap. 1, p. 23-49.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANTOS, M.I.; CAVACO, A.; GOUVEIA, J.; NOVAIS, M.R.; NOGUEIRA, P.J.; PEDROSO, L.; FERREIRA, M.A.S.S. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. **Food Control**, v. 23, p. 275-281, 2012.

SAÑUDO-BARAJASA, J.A.; LABAVITCH, J.; GREVE, C.; OSUNA-ENCISO, T.; MUY-RANGEL, D.; SILLER-CEPEDA, J. Cell wall disassembly during papaya softening: Role of ethylene changes in composition, pectin-derived oligomers (PDOs) production and wall hydrolases. **Post harvest Biology and Technology**, v. 51, p. 158–167, 2009.

SAULNIER, D.M.A.; SPINLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.135–141, 2009.

SAW, L.K.; CHEN, S.; WONG, S.H.; TAN, S.A.; GOH, K.K.T. Fermentation of tropical fruit juices by lactic acid bacteria. In: ASEAN Food Conference, 12., 2011, Bangkok, Thailand, 16 to 18 June, 2011, p. 80-87.

SCHMIDT, F.L.; PEREIRA, K.S. O Potencial dos Probióticos e Prebióticos em Bebidas de Origem Vegetal. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA,

J.A.F. (Eds.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. Cap. 23, p. 565-582.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food
SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

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

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

SHEELA, T.; SUGANYA, R.S. Studies on Anti Diarrhoeal Activity of Synbiotic Plums Juice. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, p. 1-5, 2012.

SHERMAN, P.M.; JOHNSON-HENRY, K.C.; YEUNG, H.P.; NGO, P.S.C.; GOULET, J.; TOMPKINS, T.A. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and enteropathogenic *E.coli* O127:H6 induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cyto-skeletal rearrangements. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5183-5188, 2005.

SILVA, F.J.M.; LIMA, D.C.N.; LAMAS, J.M.N.; MARTINS, E.M.F.; MARTINS, M.L. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em couve minimamente processada e avaliação físico-química. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas - Hortaliças, VI, 2011, Nova Friburgo, R.J. **Anais...** Nova Friburgo, 26 a 28 de outubro, 2011. CD-ROM.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S287-S290, 2011.

SOARES, R.F.; PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; CAMILLOTO, G.P.; OLIVEIRA, I.R.N. Aplicação de revestimento comestível probiótico em melão minimamente processado. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 26., Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2 a 6 de outubro, 2011. CD-ROM.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SPIER, M.R.; MEDEIROS, A.B.P.; YAMAGUISHI, C.T.; LINDNER, J.D.; PANDEY, A.; SOCCOL, V.T. The Potential of Probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p. 413–434, 2010.

SOLOMON, E.B.; BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E. Biology of foodborne pathogens on produce. In: Matthew, K.R. (Ed.). **Emerging issues in food safety. Microbiology of Fresh Produce**. Washington, D.C.: ASM Press, 2006. p. 55–48.

STRINGHETA, P.C.; AQUINO, A.M.; VILELA, M.A.P. Legislação Brasileira sobre Alimentos “Funcionais”. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. (Eds.). **Alimentos Funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. Cap. 2, p. 09-35.

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

TANGULER, H.; ERTEN, H. Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of shalgam (salgam), a traditional Turkish fermented beverage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 36-41, 2012.

TAPIA, M.S.; ROJAS-GRAU, M.A.; CARMONA, A.; RODRIGUEZ, F.J.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Use of alginate and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1493–1503, 2008.

TAPIA, M.S.; ROJAS-GRAÜ, M.A.; RODRÍGUEZ, F.J.; RAMÍREZ, J.; CARMONA, A.; MARTIN-BELLOSO, O. Alginate and gellan based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. **Journal of Food Science**, v. 72, p. E190-E196, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed. 2007. 894p.

TRIAS, R.; BAÑERAS, L.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p. 50–60, 2008.

VERGARA, C.M.A.C.; HONORATO, T.L.; MAIA, G.A.; RODRIGUES, S. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 141-145, 2010.

VIANA, M.M.; SABIO, R.P. Processamento mínimo é só servir. **Hortifruti Brasil**, ano 7, n. 70, Julho/2008.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.

WINTER, J. Probiotics: the potential of billions. 2008. Disponível em: <http://newhope360.com/probiotics-potential-billions>. Acesso em: 06 mar. 2012.

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

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

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

YU, Z.H.; ZHANG, X.; LI, S.Y.; LI, C.Y.; LI, D.; YANG, Z.N. *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese Sauerkraut. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 4868-4875, 2012.

ZENEON, O.; PASCUET, N.S. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2004.

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; DU, M.; YI, H.; GUO, C.; TUO, Y.; HAN, X.; LI, J.; ZHANG, L.; YANG, L. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. **Microbiological Research**, v. 167, p. 27– 31, 2011.