

PATRICIA MARTINS DE OLIVEIRA

**SUCO MISTO POTENCIALMENTE PROBIÓTICO DE MANGA E CENOURA
PROCESSADO TERMICAMENTE E POR ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA**

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
2018

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

T

O48s
2018

Oliveira, Patrícia Martins de, 1990-

Suco misto potencialmente probiótico de manga e cenoura processado termicamente e por alta pressão isostática / Patrícia Martins de Oliveira. – Viçosa, MG, 2018.

xii, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Afonso Mota Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Probióticos. 3. Alta Pressão (Tecnologia). 4. Suco de frutas. 5. Suco de hortaliças.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

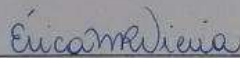
CDD 22. ed. 664.028

PATRICIA MARTINS DE OLIVEIRA

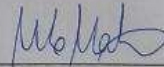
SUCO MISTO POTENCIALMENTE PROBIÓTICO DE MANGA E CENOURA
PROCESSADO TERMICAMENTE E POR ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA

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*.

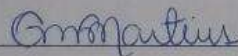
APROVADA: 28 de setembro de 2018.



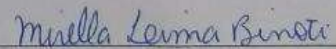
Érica Nascif Rufino Vieira



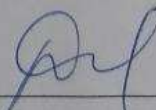
Maurilio Lopes Martins



Eliane Maurício Furtado Martins
(Coorientadora)



Mirella Lima Binoti



Afonso Mota Ramos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado o dom da vida e me proporcionado sabedoria e paciência para chegar até aqui. Agradeço também por estar ao meu lado em todos os momentos.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, *campus* Rio Pomba, pela 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 pelas palavras de incentivo ao longo do curso. Agradeço também pelos conselhos, ensinamentos, apoio, amizade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus coorientadores Eliane e Marcelo obrigada pelas sugestões e análises significativas, além do carinho e amizade que sempre tiveram comigo.

Aos professores Maurilio, Érica e Mirella que aceitaram participar da minha banca.

Aos meus pais, José Geraldo e Aparecida, obrigada por tudo que vocês me deram e me ensinaram. Obrigada pela generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. A vocês, pais queridos, que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

Aos meus avós, Zé Dias e Peinha, e minha irmã e cunhado, Elaine e Franco, agradeço pelo apoio e palavras de carinho.

Ao meu amado, Bruno, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Graças ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Sem você teria sido impossível chegar até aqui!

A equipe do laboratório LAFRUHTEC pelos momentos compartilhados.

As amigas Ariana, Carol, Dani e Nataly, meu agradecimento pela amizade, apoio e agradável convivência.

Ao professor Marcelo Cristianini por permitir a utilização do equipamento de alta pressão isostática.

Ao Leandro (UNICAMP) por ter me ajudado no processo de alta pressão isostática.

Aos técnicos dos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG *campus* Rio Pomba por terem me auxiliado em parte do experimento: Renata, Rosélio, Patrícia e Jonathan.

A família Leite, agora também minha família, obrigada pelas palavras de apoio e incentivo.

Aos amigos Eliane e Maurílio, não tenho palavras para agradecer tudo o que fazem por mim, não só na vida acadêmica, mas também na vida pessoal! Vocês são incríveis!

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	2
Objetivo geral	2
Objetivos específicos	2
CAPÍTULO 1	3
REFERENCIAL TEÓRICO	3
1. Suco de frutas	3
2. Alimentos funcionais	4
3. Probióticos	6
3.1. Gênero <i>Lactobacillus</i>	11
3.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	11
3.3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	12
3.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	13
4. Tratamento térmico	13
5. Alta pressão isostática (API)	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2	29
Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli	29
Abstract	29
1. Introduction	30
2. Material and methods	31
2.1. Obtaining mango and carrot pulps	31
2.2. Preparation and processing of mango and carrot mixed juices	32
2.3. Preparation and addition of probiotics in mixed juice	32

2.4. Physical-chemical characteristics	34
2.5. Viability of probiotic cultures in mango and carrot mixed juice	35
2.6. Evaluation of the survival of the probiotic microorganism to <i>in vitro</i> simulated gastrointestinal conditions.....	35
2.7. Statistical analysis	36
3. Results and discussion	36
3.1. pH, acidity and viability of probiotics in the pre-inoculum of mango and carrot mixed juices	36
3.2. Physico-chemical characteristics of mango and carrot probiotic mixed juice .	38
3.3. Color.....	40
3.4. Viability of probiotic microorganisms in mango and carrot mixed juices	41
3.5. Survival of <i>L. plantarum</i> to <i>in vitro</i> simulated gastrointestinal conditions.....	43
4. Conclusions	45
5. Acknowledgments.....	46
6. References	46
CAPÍTULO 3	52
Suco misto de manga e cenoura processado termicamente e por alta pressão isostática adicionado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	52
Resumo.....	52
1. Introdução	53
2. Material e métodos.....	55
2.1. Preparo das polpas e elaboração do suco misto	55
2.1.1. Processamento das polpas de manga e cenoura	55
2.1.2. Elaboração dos sucos mistos de manga e cenoura	55
2.2. Processamento do suco misto	55
2.2.1. Processamento por alta pressão isostática	55
2.2.2. Tratamento térmico de pasteurização.....	56
2.2.3. Preparo e adição de <i>L. plantarum</i> aos sucos mistos.....	56
2.3. Determinação das características microbiológicas.....	56
2.3.1. Viabilidade de <i>L. plantarum</i> em suco misto de manga e cenoura.....	56

2.3.2. Determinação da qualidade microbiológica	57
2.4. Avaliação das características químicas e físicas das polpas e dos sucos	57
2.4.1. Análises de pH, acidez e sólidos solúveis totais	57
2.5. Determinação da capacidade antioxidante	58
2.5.1. Preparação do extrato	58
2.5.2. Atividade sequestrante do radical livre DPPH	58
2.5.3. Atividade antioxidante pelo método do ABTS ⁺⁺	58
2.6. Extração e determinação de α -caroteno e β -caroteno	59
2.7. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO) e de peroxidase (POD)	60
2.8. Análise sensorial	61
2.9. Análise Estatística	62
3. Resultados e Discussão	62
3.1. Caracterização físico-química e qualidade microbiológica das polpas de manga e cenoura	62
3.2. Determinação das características microbiológicas dos sucos	63
3.2.1. Viabilidade de <i>L. plantarum</i> em suco misto de manga e cenoura.....	63
3.1.2. Qualidade microbiológica	65
3.3. Avaliação das características químicas e físicas dos sucos.....	66
3.3.1. pH, acidez e sólidos solúveis totais	66
3.4. Capacidade antioxidante dos sucos	69
3.5. Determinação de α -caroteno e β -caroteno	70
3.6. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD)...	71
3.7. Análise Sensorial.....	73
4. Conclusão	74
5. Referências Bibliográficas	74
CONCLUSÃO GERAL	81

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figure 1. Scheme of the experiment.....	33
Figure 2. Evaluation of pH, acidity and viability of probiotic microorganisms in pre-inoculum after 24 h of incubation at 37 °C.	37
Figure 3. Evaluation of the pH of different formulations of probiotic mixed juices	39
Figure 4. Evaluation of the acidity of the different formulations of probiotic mixed juices.	40
Figure 5. Evaluation of the probiotic microorganisms viability in the different formulations of mixed juices.....	42
Figura 6. Survival of <i>L. plantarum</i> in different formulations of mango and carrot mixed juice submitted to in vitro simulated gastrointestinal conditions.....	44

CAPÍTULO 3

Figura 1. Avaliação da viabilidade de <i>L. plantarum</i> em suco misto processado por alta pressão (suco misto API) e por pasteurização (suco misto pasteurizado).	64
Figura 2. Avaliação do pH (A) e acidez (B) do suco misto.....	67
Figura 3. Conteúdo de sólidos solúveis totais de suco misto de manga e cenoura.....	68
Figura 4. Avaliação da capacidade antioxidante de suco misto de manga e cenoura processado por API e pasteurizado com ou sem adição de <i>L. plantarum</i>	69
Figura 5. Avaliação do teor relativo de α -caroteno (A) e β -caroteno (B) de suco misto de manga e cenoura processado por API e pasteurizado com ou sem adição de <i>L. plantarum</i>	71
Figura 6. Atividade relativa de polifenoloxidase (PPO) (A) e peroxidase (POD) (B) de suco misto de manga e cenoura processado por API e pasteurizado com ou sem <i>L. plantarum</i>	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Micro-organismos usados como probióticos.....	7
Tabela 2. Estudos recentes sobre a utilização de micro-organismos probióticos em matrizes vegetais	10

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Características das polpas de manga e cenoura.....	62
Tabela 2. Número Mais Provável de coliformes a 30 e a 45 °C e contagem de micro-organismos psicotróficos em suco misto de manga e cenoura tratado por API e pasteurizado com e sem adição de <i>L. plantarum</i>	65
Tabela 3. Aceitação sensorial de suco misto probiótico processado por API e pasteurizado.....	73

RESUMO

OLIVEIRA, Patrícia Martins de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2018. **Suco misto potencialmente probiótico de manga e cenoura tratado termicamente e por alta pressão isostática.** Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadores: Eliane Maurício Furtado Martins e Marcelo Cristianini.

A produção de suco misto tem a vantagem de combinar os benefícios de frutas ou hortaliças, originando um novo produto com melhor valor nutricional. Para a conservação de sucos, a pasteurização é o tratamento mais aplicado, no entanto, o uso de temperaturas elevadas pode levar a perdas sensoriais e nutricionais irreversíveis. A alta pressão isostática (API) é um método de conservação a frio que diminui essas alterações e garante a qualidade do produto ao longo da vida de prateleira. Os sucos têm sido estudados como uma nova matriz para o carregamento de bactérias probióticas, porque é cada vez maior o número de indivíduos que não consomem produtos lácteos. Portanto, este trabalho objetivou elaborar suco misto de manga e cenoura processado por API e por pasteurização adicionado de probiótico. Na primeira etapa do projeto, foram produzidas 3 formulações de suco misto, variando as proporções de manga e cenoura, adicionadas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus* a fim de verificar qual micro-organismo apresentava maior viabilidade. Em seguida, o suco foi submetido às condições gastrointestinais simuladas por meio de ensaio *in vitro* para verificar em qual formulação haveria maior resistência do probiótico no intestino grosso. Na segunda etapa do trabalho, a formulação que apresentou maior resistência do probiótico ao trato gastrointestinal (TGI) foi processada por API e por pasteurização, seguida de adição do micro-organismo com maior contagem. O suco foi submetido à análises microbiológicas, físico-químicas, capacidade antioxidante, conteúdo de α -caroteno e β -caroteno, atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) e análise sensorial para verificar a influência do método de conservação aplicado e da presença do probiótico na qualidade do produto ao longo de 35 dias de estocagem a 8 °C. O micro-organismo que apresentou maior viabilidade foi *L. plantarum*. Após simulação do TGI *in vitro*, selecionou-se a formulação que continha a mesma proporção de polpa de manga e cenoura (1:1) por ter promovido a maior manutenção da viabilidade de *L. plantarum*. O processamento, por API ou por pasteurização, não influenciou na viabilidade de *L. plantarum*. A API manteve a qualidade microbiológica do produto por 35 dias de

armazenamento a 8 °C enquanto, os sucos pasteurizados, apresentaram contagens elevadas de micro-organismos psicotróficos aos 35 dias de estocagem. Os métodos de conservação aplicados não afetaram as características físico-químicas dos sucos mistos. Entretanto, a presença de *L. plantarum* causou diminuição do pH e aumento da acidez dos sucos mistos ao longo do período de estocagem ($p < 0,05$), mas não afetou a capacidade antioxidante, conteúdo de α -caroteno e β -caroteno e atividade enzimática dos sucos. O processamento por API não influenciou na capacidade antioxidante do suco misto ($p > 0,05$), por outro lado, os sucos pasteurizados tiveram um decréscimo na capacidade antioxidante ($p < 0,05$) e uma redução média de 30% no conteúdo total de α -caroteno e β -caroteno. A pasteurização reduziu a atividade das enzimas PPO e POD ($p < 0,05$) e a API promoveu redução na atividade de PPO e aumento, de cerca de 30%, na atividade de POD. Em relação a aceitação sensorial, todos os sucos testados tiveram boa aceitação pelos consumidores, apresentando notas médias acima de 6, no entanto, o suco misto processado por API sem a adição de *L. plantarum* foi o mais aceito (nota média igual a 8,0) ($p < 0,05$). Portanto, o processamento por API mostrou-se melhor que a pasteurização, uma vez que manteve as características sensoriais dos sucos. Além disso, a matriz testada se mostrou eficiente para a manutenção da viabilidade de *L. plantarum*, podendo ser uma alternativa, como alimento probiótico, e atender também os indivíduos que não consomem derivados lácteos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Patrícia Martins de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2018. **Potentially probiotic mixed juice of mango and carrot treated thermally and by high isostatic pressure.** Advisor: Afonso Mota Ramos. Co-advisors: Eliane Maurício Furtado Martins and Marcelo Cristianini.

The production of mixed juice has the advantage of combining the benefits of fruits or vegetables, giving rise to a new product with better nutritional value. For the conservation of juices, pasteurization is the most applied treatment, however, the use of high temperatures can lead to irreversible sensorial and nutritional losses. High Isostatic Pressure (HIP) is a cold conservation method that reduces these changes and ensures product quality over the life of the product. Juice has been studied as a new matrix for the transport of probiotic bacteria because the number of individuals who do not consume dairy products is increasing. Therefore, the objective of this work was to elaborate mixed juice of mango and carrot processed by HIP and pasteurization added of probiotic. In the first stage of the project, 3 formulations of mixed juice were produced, varying the proportions of mango and carrot, added of *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*, in order to verify which microorganism present greater viability. Then, the juice was subjected to simulated gastrointestinal conditions by *in vitro* assay to verify in which formulation there would be greater resistance of the probiotic in the large intestine. In the second stage of the study, the formulation that presented greater resistance of the probiotic to the gastrointestinal tract (GIT) was processed by HIP and by pasteurization, followed by the addition of the microorganism with higher counting. The juice was submitted to microbiological, physical-chemical, antioxidant capacity, α -carotene and β -carotene content, polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) activity and sensory analysis to verify the influence of the applied conservation method and of the presence of the probiotic in product quality over 35 days of storage at 8 °C. The most viable microorganism was *L. plantarum*. After simulation of GIT *in vitro*, the formulation containing the same ratio of mango and carrot pulp (1:1) was selected because it promoted the greater maintenance of the viability of *L. plantarum*. Processing by HIP or by pasteurization did not influence the viability of *L. plantarum*. The HIP maintained the microbiological quality of the product for 35 days of storage at 8 °C while the pasteurized juices presented high counts of psychrotrophic microorganisms at 35 days

of storage. The conservation methods applied did not affect the physico-chemical characteristics of mixed juices. However, the presence of *L. plantarum* caused a decrease in pH and increased acidity of mixed juices over the storage period ($p < 0.05$), but did not affect the antioxidant capacity, α -carotene and β -carotene content, and enzymatic activity of juices. The HIP processing did not influence the antioxidant capacity of the mixed juice ($p > 0.05$), on the other hand, pasteurized juices had a decrease in antioxidant capacity ($p < 0.05$) and a mean reduction of 30 % in the total content of α -carotene and β -carotene. Pasteurization reduced the activity of the PPO and POD enzymes ($p < 0.05$) and the HIP promoted a reduction in PPO activity and an increase of about 30 % in POD activity. In relation to the sensory acceptance, all the juice tested had good acceptance by consumers, presenting average scores above 6, however, the mixed juice processed by HIP without the addition of *L. plantarum* was the most accepted (average score equal to 8.0) ($p < 0.05$). Therefore, the HIP processing proved to be better than pasteurization, since it maintained the sensory characteristics of the juices. In addition, the tested matrix proved to be efficient for the maintenance of the viability of *L. plantarum*, which could be an alternative, as a probiotic food, and also serve individuals who do not consume dairy products.

INTRODUÇÃO GERAL

A busca dos consumidores por uma dieta saudável e que traga benefícios a saúde, além da nutrição básica, impulsionou a indústria de alimentos a desenvolver novos produtos e a utilizar novas tecnologias de fabricação para o desenvolvimento de produtos que contenham ingredientes funcionalmente ativos, como os probióticos.

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO) definem probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Essa ingestão diária recomendada, para que se tenha efeitos benéficos, pode variar entre 10^6 e 10^{10} células por grama ou mililitro do produto.

A procura por novas matrizes alimentares como veículos dessas bactérias em alternativa aos produtos lácteos está crescendo devido a problemas como intolerância e alergia aos derivados lácteos, aumento de pessoas veganas e dietas com restrição de colesterol. Dessa forma, produtos de origem vegetal tem sido amplamente estudados como alternativa para incorporação de bactérias probióticas na dieta e como exemplos têm-se sucos, néctar, polpa, vegetais minimamente processados, bebidas a base de soja, entre outros.

Para fabricação de sucos, o tratamento térmico é um dos métodos de conservação mais utilizados, uma vez que a ação do calor promove a inativação de micro-organismos e enzimas. No entanto, a utilização de temperaturas elevadas pode levar a perda de compostos nutricionais, propriedades antioxidantes e alterações físico-químicas indesejáveis nos produtos. Com isso, tecnologias não térmicas vem sendo exploradas a fim de sanar esses problemas e, dentre elas, destaca-se a alta pressão isostática (API).

O processamento por API consiste em submeter o produto à pressão de até 1.000 MPa por um tempo e temperatura controlados, sendo a pressão transmitida de maneira uniforme e instantânea por todo o alimento, independente da sua forma, tamanho ou volume (princípio "isostático"). Além disso, seguindo o princípio de "Le Chatelier", o aumento da pressão induz a redução de volume molecular, acelerando a ocorrência de reações químicas, bioquímicas e biológicas que podem ser favorecidas nessas condições.

Assim, o uso da API para produção de sucos torna-se vantajoso devido a sua eficácia na inativação microbiológica e enzimática, e por manter os principais atributos de qualidade dos alimentos, como valor nutricional e propriedades sensoriais. Pelo fato

da API afetar, principalmente, ligações covalentes (que possuem baixa compressibilidade comparadas as ligações não covalentes), moléculas de baixo peso molecular, aminoácidos e vitaminas são raramente afetados.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver suco misto probiótico de manga e cenoura processado termicamente e por alta pressão isostática.

Objetivos específicos

- ✓ Definir o micro-organismo probiótico (*L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* LV299[®] e *L. acidophilus* LA-14) que apresenta a maior viabilidade em suco misto de manga e cenoura;
- ✓ Realizar ensaios *in vitro* de resistência ao trato gastro intestinal (TGI) para determinar a formulação do suco misto de manga e cenoura que ofereça a maior viabilidade para o probiótico selecionado;
- ✓ Desenvolver suco misto de manga e cenoura pasteurizado e tratado por alta pressão isostática (API) adicionado de probiótico;
- ✓ Avaliar a viabilidade do probiótico nos sucos obtidos por meio de análises microbiológicas;
- ✓ Determinar as características físico-químicas do suco misto de manga e cenoura, pasteurizados e tratados por alta pressão isostática, adicionado de probiótico, bem como sua qualidade microbiológica ao longo da vida de prateleira;
- ✓ Determinar a capacidade antioxidante e teor de α -caroteno e β -caroteno dos sucos obtidos ao longo da vida de prateleira;
- ✓ Determinar a atividade enzimática de polifenoloxidase e peroxidase no suco misto de manga e cenoura, pasteurizados e tratados por alta pressão isostática, adicionado de probiótico;
- ✓ Determinar a aceitabilidade sensorial dos sucos produzidos.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Suco de frutas

O aumento do consumo de vegetais é decorrente da preocupação das pessoas com a saúde, pois estudos têm demonstrado que o consumo regular de frutas é um grande aliado na redução do risco de desenvolvimento de diversas doenças, uma vez que as frutas são ricas em vitaminas, carotenoides, compostos fenólicos e outros componentes importantes (FARAONI et al., 2013).

Com o aumento dessa conscientização da relação entre dieta e saúde, os sucos de frutas têm ganhado mais mercado. Dados da Associação Europeia dos Produtores de Suco de Fruta (AIJN) mostraram que o mercado global de sucos de frutas somou um total de 38,6 milhões de litros em 2014 (AIJN, 2015). No Brasil, no mesmo ano, esse consumo foi de 1,025 milhão de litros (SINCONGEL, 2016), sendo o suco de laranja o líder de mercado.

De acordo com o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, suco é a bebida não fermentada, não concentrada, ressalvados casos específicos, e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo (BRASIL, 2009). Caso a fruta que dê origem ao suco seja tropical, o suco é designado suco tropical, sendo o mesmo obtido pela dissolução da polpa da fruta tropical em água potável ou em suco clarificado de fruta tropical, mantendo as características de cor, aroma e sabor da fruta de origem (BRASIL, 2009). A manga é classificada como fruta tropical. Ainda segundo o mesmo Decreto, suco misto é a mistura de duas ou mais frutas, ou combinação de fruta e hortaliça, obedecendo os padrões de qualidade especificado para sucos.

A produção de suco misto tem sido bastante explorada, uma vez que combina o valor nutricional de frutas ou hortaliças com a vantagem de um sabor agradável, com boa aceitação pelos consumidores, sendo uma importante fonte de vitaminas, minerais e carboidratos solúveis. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de bebidas mistas permite a obtenção de novos sabores, e melhoria da cor e consistência dos produtos ofertados.

A manga é uma fruta tropical amplamente consumida em várias partes do mundo e possui gosto doce, sabor exótico e suculência. A maioria das frutas são consumidas frescas ou como produtos processados, como sucos. É uma fruta que tem elevado valor nutritivo, fornecendo a dieta humana nutrientes tais como fibras, vitaminas e minerais. Além disso, a manga possui compostos bioativos (MATHEYAMBATH; SUBRAMANIAN; PALIYATH, 2016), como β -caroteno, ácido ascórbico e compostos polifenólicos (NARESH et al., 2015) que possuem ação antioxidante. Pelo fato de sua vida útil ser curta, a produção de suco se torna uma alternativa para sua comercialização (JHA; GUNASEKARAN, 2010), mesmo em períodos de entressafra.

Além da utilização de frutas para produção de sucos, outros vegetais também tem ganhado destaque para elaboração de bebidas mistas. Dentre eles, a cenoura possui um grande potencial, uma vez que, assim como a manga, possui em sua composição fitonutrientes como carotenoides, vitaminas e minerais (JABBAR et al., 2014).

Muitos estudos têm sido realizados com suco de cenoura (ZHANG et al., 2016; KAUR; AGGARWAL, 2016; MARTÍNEZ-FLORES et al., 2015; KHALIL et al., 2015), em mistura com outras frutas, para estabilizar o produto, com diminuição do pH, o tratamento térmico também é empregado para estender a vida útil da bebida (PICOUET et al., 2015).

2. Alimentos funcionais

Na década de 1980, os alimentos funcionais se tornaram tendência no Japão. Essa concepção de alimento, lançada através de um programa de governo, tinha por objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e que apresentava maior expectativa de vida (ANJO, 2004). Em decorrência disso, em 1991, esses alimentos foram regulamentados pela legislação japonesa, com a denominação de Alimentos para Uso Específico na Saúde (*Foods for Specified Health Use - FOSHU*) (TEE, 2004; ARAI et al., 2001), cujo termo é usado no Brasil como "alimentos funcionais" (COSTA; ROSA, 2010).

“Alimentos funcionais” é um termo relativamente novo usado para descrever produtos alimentícios que foram enriquecidos com componentes naturais com efeito fisiológico específico de promoção da saúde (VUKASOVIĆ, 2017). Uma definição mais completa descreve os alimentos funcionais como sendo aqueles que beneficiam

uma ou mais funções orgânicas, além da nutrição básica, contribuindo para melhorar o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de doenças (DIPLOCK et al., 1999).

Um alimento funcional pode ser um alimento natural ou um alimento processado adicionado de um ou mais componentes específicos, que tenha influência positiva na saúde e bem-estar do consumidor, proporcionando benefícios ao indivíduo, principalmente no início do desenvolvimento e crescimento, na regulação de processos metabólicos, na defesa contra o estresse oxidativo, na melhora das funções cardiovascular e gastrointestinal, auxiliando no desempenho cognitivo e mental (TUR; BIBILONI, 2016).

No Brasil, não existe uma definição clara do termo "alimento funcional", havendo a denominação "alegação de propriedade funcional". De acordo com a Resolução nº 18 e 19, de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b).

Independentemente da definição oficial desses alimentos, a demanda por parte dos consumidores por alimentos mais saudáveis que possam diminuir o risco de doenças sem efeitos colaterais, além do valor nutricional melhorado (VIJAYENDRA; HALAMI, 2015), incentivou as pesquisas e o desenvolvimento de produtos. A fim de se adaptar a esses consumidores, a indústria de alimentos está reformulando seus produtos com o objetivo de melhorar a função de nutrientes inerentes ou, até mesmo, adicionando novos ingredientes bioativos que possuem função fisiológica já comprovada.

Alimentos que possuem em sua composição componentes bioativos como os probióticos, prebióticos, fibras vegetais, fitoquímicos, compostos com capacidade antioxidante, vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3 e 6), entre outros compostos, em quantidades adequadas, são exemplos de alimentos com alegação de propriedade funcional (VIZZOTTO; KROLOW; TEIXEIRA, 2010).

Devido à busca incansável por parte dos pesquisadores por novos alimentos com alegação de propriedades funcionais, bem como, de novas descobertas a respeito da funcionalidade dos compostos já conhecidos, muitos estudos precisam ser realizados para que se possa aumentar a disponibilidade desses produtos no mercado.

3. Probióticos

A crescente conscientização sobre a melhoria da saúde intestinal e a comprovação da eficiência das bactérias probióticas, são responsáveis pelo desenvolvimento do mercado global de produtos probióticos (SAVEDBOWORN et al., 2017), que deverá crescer de US \$ 62,6 bilhões em 2014 para US \$ 96 bilhões em 2020 (TRIPATHI, 2018).

A palavra "probiótico" é derivada do termo grego "pro bios", que significa "para a vida" (BAGCHI, 2014) e foi usada pela primeira vez em 1954 para descrever substâncias necessárias para uma vida saudável (BINNS, 2013). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde, probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001) e são amplamente usados como um suplemento alimentar microbiano vivo que pode melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (SANDERS, 2003). Em agosto de 2014 a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) recomendou essa definição e, de acordo com a ISAPP, o termo probiótico deve ser usado apenas em produtos que oferecem os micro-organismos vivos em contagem maior ou igual a 10^6 UFC/g do produto (BULTOSA, 2016).

Visto que a definição destaca que os probióticos devem ser micro-organismos vivos, uma das principais questões relativas às formulações contendo essas bactérias é a perda da viabilidade após o processamento e durante o armazenamento. Muitos fatores, tais como a temperatura, teor de oxigênio, nível de umidade e pressão têm influência sobre a viabilidade dos probióticos e, assim, sobre sua atividade de promoção da saúde (BROECKX et al., 2016).

A maior parte das estirpes bacterianas comumente usadas em produtos probióticos são bactérias do ácido lático (ou seja, que produzem ácido lático como maior produto da fermentação de carboidratos) como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, além do gênero *Bifidobacterium* (DORON; SNYDMAN, 2015; PRADO et al., 2015; SOCCOL et al., 2015), com alguns exemplos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Bactérias usadas como probióticas

Gênero	Espécie
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus bifidus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus gallinarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> , <i>Lactobacillus vitulinus</i> , <i>Lactobacillus collinoides</i> , <i>Lactobacillus cremoris</i> , <i>Lactobacillus rumines</i> , <i>Lactobacillus dextranicum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus faecium</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium brevis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium essencis</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus coagulans</i> (GanedenBC30), <i>Bacillus lactis</i> DR10, <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> R0179, <i>Bacillus subtilis</i> (natto) OUV23481
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus halophilus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>cremoris</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranium</i> , <i>paramesenteroides</i> ou <i>lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus diacetilactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>Streptococcus equinus</i>
<i>Weissella</i>	<i>Weissella cibaria</i> , <i>Weissella confusa</i>

Fonte: BULTOSA (2016)

Além desses, algumas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, e alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae* e *Scytalidium acidophilum* também são considerados micro-organismos probióticos (BULTOSA, 2016).

Vários mecanismos associados às estirpes probióticas e que exercem efeitos sobre a saúde do hospedeiro têm sido relatados, incluindo a produção de substâncias antimicrobianas, melhoria da função de barreira epitelial intestinal, controle da infecção gastrointestinal, melhoria da resposta imune do hospedeiro, inibição de agentes causadores de doenças, exclusão competitiva de micro-organismos patogênicos e aumento da digestibilidade dos alimentos (HAUKIOJA, 2010; JENSEN et al., 2012; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). Mais especificamente, os alguns efeitos benéficos associados a ingestão de bactérias probióticas, podem ser citados de acordo com Pereira et al. (2018):

- *Efeitos anticarcinogênicos*: produção de compostos com atividade anticarcinogênica; ligação e degradação de compostos com potencial mutagênico; redução da atividade de enzimas envolvidas na formação de agentes carcinogênicos; inibição da proliferação de células tumorais; indução da apoptose em células cancerígenas (COMMANE et al., 2005; KUMAR et al., 2013);

- *Atividade anti-colesterol*: os probióticos diminuem a solubilidade do colesterol, reduzindo sua captação pelo intestino; desconjugação enzimática dos ácidos biliares no intestino humano, facilitando a liberação pelo organismo humano através das fezes (NGUYEN; KANG; LEE, 2007).

- *Anti-depressão e anti-ansiedade*: os probióticos possuem efeito sobre o humor, aumenta o sistema imunológico e a serotonina (LUNA; FOSTER, 2015). e reduzem os hormônios relacionados ao estresse.

- *Atividades anti-obesidade e anti-diabetes*: os probióticos podem reduzir o ganho de peso e a resistência à insulina modulando a composição da microbiota intestinal e estimulando a formação de hormônios intestinais, como o peptídeo-1 semelhante ao glucagon e o polipeptídeo inibitório gástrico (ZHANG; WU; FEI, 2016; KERRY et al., 2018), além disso, essas bactérias podem utilizar fontes de energia para o seu metabolismo (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2014).

Os efeitos benéficos dos probióticos são dependentes da dose e da ingestão diária recomendada que variam entre 10^6 e 10^9 células por grama ou mililitro do produto (GIALAMAS et al., 2010; MADUREIRA et al., 2011; SHORI, 2015). Essa viabilidade deve permanecer suficientemente elevada, a partir da inoculação, resistindo ao processamento, armazenamento e a digestão no trato gastrointestinal (MADUREIRA et al., 2011).

Alguns critérios devem ser considerados para que um micro-organismo seja classificado como probiótico, como resistência à passagem através do trato gastrointestinal; capacidade de sobreviver no ambiente intestinal (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010); tolerância ao ácido e a bile; aderência às superfícies epiteliais; atividade antagônica para patógenos intestinais; não apresentar patogenicidade; entre outros (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Caso a estirpe bacteriana ingerida em grandes concentrações não sobreviva a digestão, o probiótico será incapaz de chegar ao intestino em forma viável, com isso não terá sua capacidade funcional (MADUREIRA et al., 2011). Por esse motivo, se faz necessária a ingestão de grandes quantidades de probióticos e também de uma avaliação *in vitro* para simular o

trato gastrointestinal a fim de se conhecer a quantidade dessas bactérias que chegarão viáveis ao intestino.

Segundo Blaiotta et al. (2013), devido ao aumento da preocupação pública com questões de saúde e a diversificação de produtos alimentares, a indústria de alimentos funcionais precisa explorar novos processos. Novas categorias de produtos e matérias-primas são certamente a chave da pesquisa e área de desenvolvimento para o mercado de alimentos funcionais, no que diz respeito à tecnologia dos probióticos. Inovações tecnológicas incluem encontrar soluções para problemas como estabilidade e viabilidade dos probióticos em novas matrizes alimentares, como frutas, cereais e outros vegetais (VASCONCELOS et al., 2014).

Os produtos lácteos são os alimentos probióticos predominantes no mercado, por possuírem características e nutrientes bem estabelecidos que promovem o crescimento e manutenção da viabilidade das bactérias lácticas. Além disso, o leite pode ajudar esses micro-organismos a tolerar as condições gastrointestinais severas, uma vez que sua capacidade tamponante pode proteger os probióticos em tais condições, reduzindo sua exposição direta às condições adversas (RANADHEERA et al., 2017). No entanto, a procura de matrizes alimentares como veículo de probióticos em alternativa aos produtos lácteos está crescendo, visto que é cada vez maior o número de indivíduos com dietas com restrições nutricionais, ou seja, colesterol total elevado, intolerantes à lactose e alérgicos aos derivados de leite; novas filosofias de vida, isto é, veganismo ou vegetarianismo; bem como os requisitos relacionados ao sabor dos produtos (SHORI, 2015; GRANATO et al., 2018). Dessa forma, o uso de vegetais tem sido amplamente discutido como uma alternativa para incorporação de bactérias probióticas na dieta, uma vez que frutas e hortaliças têm nutrientes que promovem o crescimento desses micro-organismos e não oferecem aos consumidores os empecilhos dos produtos lácteos (MARTINS et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que as frutas apresentam potencial para atuarem como veículo de probióticos com uma alta viabilidade celular em função das características intrínsecas dos vegetais (MARTINS et al., 2016). Estas características aliadas à presença de prebióticos naturais, parecem proteger os micro-organismos probióticos à medida que passam pelo trato gastrointestinal. Alimentos probióticos de origem vegetal incluem sucos fermentados ou não fermentados, frutas e hortaliças minimamente processadas, purês, entre outros (MARTINS et al., 2013; SHORI, 2015). Os sucos de frutas ou hortaliças podem ser considerados um bom meio para carrear bactérias

probióticas aos consumidores, uma vez que possuem perfis de sabor que são atraentes a todas as faixas etárias e, também, porque são percebidos como alimentos saudáveis e refrescantes, sendo consumidos por grande parte da população diariamente, fator essencial para que os probióticos exerçam suas funções (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Na Tabela 2 estão apresentados alguns estudos mais recentes sobre a utilização de matrizes vegetais para veiculação de probióticos.

Tabela 2. Estudos recentes sobre a utilização de micro-organismos probióticos em matrizes vegetais

Matriz alimentar	Produto alimentício	Micro-organismo utilizado	Referência
Maçã	Suco	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	Pimentel et al. (2015)
Moringa e beterraba	Bebida	<i>L. plantarum</i> e <i>Enterococcus hirae</i>	Vanajakshi et al. (2015)
Macã, banana e morango	Fruta seca	<i>L. plantarum</i> 299v	Borges et al. (2016)
Abacaxi, banana, goiaba, maçã, mamão e manga	Salada de frutas minimamente processada	<i>L. rhamnosus</i> HN001	Martins et al. (2016)
Cereja	Suco	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> , <i>L. casei</i> TD4 e T4	Nematollahi et al. (2016)
Mirtilo e cenoura	Suco misto	<i>Lactobacillus reuteri</i> LR92	Mauro; Guergoletto; Garcia (2016)
Juçara e manga	Suco misto	<i>L. rhamnosus</i> GG	Moreira et al. (2017)
Melão	Minimamente processado	<i>L. acidophilus</i>	Oliveira et al. (2017)
Laranja	Suco	<i>L. paracasei</i>	Costa et al. (2017)
Cenoura e laranja	Suco e néctar	<i>L. acidophilus</i> ATCC4356	Valero-Cases; Frutos (2017)
Arroz	Extrato de arroz fermentado	<i>L. plantarum</i>	Savedboworn et al. (2017)
Soja	Extrato de soja fermentado	<i>L. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis subsp. lactis</i> Bb-12 e <i>S. thermophilus</i>	Battistine et al. (2018)
Cacau	Chocolate branco	<i>L. acidophilus</i> La-14 ATCC SD5212 e <i>L. paracasei</i> Lpc-37 ATCC SD5275	Konar et al. (2018)
Maçã	Suco fermentado	<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	Roberts et al. (2018)
Cacau	Suco	<i>L. casei</i>	Santos Filho et al. (2019)

3.1. Gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são bactérias em forma de bastonetes ou cocobacilos, Gram-positivas, microaeróbicas, não produtoras de esporos (CHENG et al., 2015). Possuem características comuns de outras bactérias lácticas como tolerância a ácidos e conversão de açúcares em ácido láctico, um dos principais produtos finais da fermentação primária. Além desse, outros produtos também podem ser gerados pelo metabolismo desses micro-organismos como acetato, etanol e CO₂ (KLAENHAMMER; De VOS, 2011; SUN et al., 2015a; CHENG et al., 2015).

Essas bactérias são exigentes nutricionalmente e dependem de meios ricos para seu desenvolvimento, uma vez que não possuem genes que codificam enzimas que sintetizam determinados nutrientes essenciais ao seu metabolismo. De acordo com Kleerebezem et al. (2010), o conhecimento do genoma dos lactobacilos mostrou um considerável grau de auxotrofia para aminoácidos e outros blocos de construção celular. Segundo os autores, esses micro-organismos parecem compensar estas "falhas" metabólicas, codificando uma grande variedade de genes com funções de importação para incorporar nutrientes ambientais em seu metabolismo.

As bactérias deste gênero estão presentes em vários ambientes, como plantas e alimentos fermentados, além de fazerem parte da microbiota natural da cavidade oral e do trato gastrointestinal de humanos e animais (KLAENHAMMER; De VOS, 2011; SUN et al., 2015). Por isso, esses micro-organismos possuem grande relevância industrial, tanto na indústria de alimentos, sendo usados na fabricação de alimentos fermentados, como culturas starters e/ou protetoras (ABRIOUEL et al., 2015), quanto na medicina (ROSALES-MENDOZA; ANGULO; MEZA, 2016) e na química (REDDY et al., 2008).

Esse gênero é o maior entre as bactérias do ácido láctico e algumas estirpes desses micro-organismos têm sido reconhecidas por seus potenciais efeitos sobre a saúde do hospedeiro. Dentre os diversos *Lactobacillus* com esse efeito probiótico, destacam-se *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. acidophilus* (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017).

3.2. *Lactobacillus rhamnosus*

L. rhamnosus é um micro-organismo heterofermentativo facultativo, ou seja, produz ácido láctico, após a fermentação de hexoses, e ácido láctico e acético, após a

fermentação de pentoses; possui forma de bastonete e é encontrado em alimentos fermentados e matérias-primas para alimentação. Também é encontrado no trato intestinal de humanos e animais, bem como no sistema oral e urogenital (CEAPA et al., 2016). Uma curiosidade a respeito desse probiótico é sua incapacidade de fermentar a lactose, maltose e sacarose, sendo essa característica usada para sua identificação por meio do teste de fermentação de lactose (SILVA et al., 1987; ALANDER et al., 1999).

L. rhamnosus GG (LGG) foi isolado em 1983 por Sherwood Gorbach e Barry Goldin e, em 1987 foi emitida uma patente nos Estados Unidos e, posteriormente, em outros países (DORON; SNYDMAN; GORBACH, 2005). Conforme a patente (US4839281 A), LGG possui estabilidade ácida, podendo crescer até pH 3,0; produz ácido lático como produto da fermentação; sobrevive ao suco gástrico humano e aos sais biliares; e possui boa aderência às células da mucosa intestinal. De acordo com Mantegazza et al. (2018), a capacidade de LGG colonizar o intestino humano é devido a produção de pili proteico e à produção de outras proteínas solúveis que são capazes de aumentar sua aderência à parede intestinal.

Segundo Laakso et al. (2011), a expressão diferencial de proteínas envolvidas nas vias metabólicas centrais de *L. rhamnosus* GG, em resposta a mudanças no ambiente nutricional (por exemplo, exaustão da fonte de carbono preferencial no meio), indicam que esse micro-organismo possui um metabolismo flexível e adaptável, o que pode fornecer uma vantagem competitiva para o LGG no trato gastrointestinal do hospedeiro.

3.3. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é um micro-organismo gram-positivo microaerófilo e heterofermentativo, com morfologia de bastonetes, ocorrendo isoladamente ou agrupado em cadeias curtas. Possui aproximadamente 0,9-1,2 x 1,0-8,0 µm de tamanho (TODOROV; FRANCO, 2010). Essa bactéria possui ampla versatilidade, uma vez que pode ser encontrada em muitos nichos ecológicos, bem como nos tratos gastrintestinais de humanos e animais (SIEZEN et al., 2010).

O comportamento flexível e adaptativo de *L. plantarum* é refletido pelo número elevado de funções reguladoras e de transporte, devido ao genoma relativamente grande e ao repertório de genes altamente redundante, permitindo que esses micro-organismos desenvolvessem sistemas de transporte muito eficientes, que lhes permitem absorver os

solutos necessários rapidamente (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993; SABO et al., 2014). Além disso, uma região próxima da origem de replicação apresenta um conteúdo anômalo de G+C, sugerindo que esteja relacionada à adaptação do "estilo de vida" o que poderia explicar a flexibilidade ambiental dessa bactéria (CLAESSON; SINDEREN; O'TOOLE, 2007).

L. plantarum pode ser apontado como um micro-organismo industrialmente importante que pode ser encontrado e isolado de produtos lácteos e alimentos fermentados como chucrute, salsichas, queijos, vinhos, azeitonas e legumes em conserva; de ambientes como esterco de vaca, silagem e esgoto; bem como da boca humana, trato intestinal e fezes (HAMMES; VOGEL, 1995; PARENTE et al., 2010).

3.4. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus são bastonetes curtos (2 a 10 μm), Gram-positivo e possuem temperatura ótima de crescimento entre 37 e 42 °C (ALTERMANN et al., 2005), podendo crescer até 45 °C, não crescendo a 15 °C (CHENG et al., 2015). Esta espécie é pouco tolerante a salinidade do meio e está entre os lactobacilos menos tolerantes ao oxigênio, com o crescimento em meio sólido favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio (GOMES, MALCATA, 1999). A espécie alcança suas maiores taxas de crescimento em meios levemente ácidos, com pH variando entre 5,5 e 6,0, e o crescimento cessa em pH abaixo de 4,0 (SHAH, 2007). *L. acidophilus* é uma bactéria homofermentativa obrigatória produtora de ácido láctico, fermentam glicose e, a maioria das estirpes, também podem fermentar amido (CHENG et al., 2015).

É um micro-organismo auxotrófico para 14 aminoácidos e é incapaz de sintetizar vários co-fatores e vitaminas incluindo riboflavina, vitamina B6, nicotinato, nicotinamida, biotina e folato (ALTERMANN et al., 2005). Esses déficits na capacidade anabólica são exemplificados pela necessidade de usar meios ricos em nutrientes para seu cultivo (BULL et al., 2013) o que, muitas vezes, justifica seu baixo crescimento em alguns ambientes.

4. Tratamento térmico

O tratamento térmico é um dos métodos físicos mais utilizados na indústria de alimentos, uma vez que a ação do calor promove a eliminação de micro-organismos,

enzimas, insetos e parasitas (FELLOWS, 2006) prolongando a vida útil dos alimentos. Além disso, o calor também promove a destruição de fatores antinutricionais e aumento da biodisponibilidade de alguns nutrientes (RAES et al., 2014). Alguns efeitos desejáveis na qualidade sensorial dos alimentos também são observados com o uso do calor, como a produção de sabores e texturas.

No entanto, a utilização de temperaturas elevadas determina a perda de compostos nutricionais, propriedades antioxidantes e alterações físico-químicas indesejáveis (OMS-OLIU et al., 2012), com destruição de alguns dos componentes sensoriais dos alimentos, responsáveis por seu sabor, cor, gosto ou textura, tendo como resultado característico a perda de qualidade e de valor do produto.

A pasteurização é o tratamento térmico mais empregado no processamento industrial de sucos, apresentando duas funções básicas: reduzir a carga microbiana inicial a níveis aceitáveis (deixando o alimento microbiologicamente seguro) e inativar complexos enzimáticos existentes que possam causar alterações sensoriais do produto (QUEIROZ; MENEZES, 2010; WANG; HU; WANG, 2010).

A presença de enzimas em sucos muitas vezes se torna um problema para a indústria de alimentos, com isso a desnaturação ou inativação das mesmas é de fundamental importância no processo de pasteurização (MÜLLER et al., 2013). A presença de enzimas ativas pode provocar reações químicas que alteram a cor, o sabor e a viscosidade da bebida (CHAKRABORTY et al., 2014).

Em sucos de frutas, as principais enzimas responsáveis pela deterioração da cor, sabor e valor nutricional são as enzimas oxidativas como a polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) (CHAKRABORTY et al., 2014). Além dessas, existem as enzimas pécnicas, as quais incluem a pectinametilesterase (PME) e a poligalacturonase (PG), que estão envolvidas na quebra da rede da pectina afetando a consistência e estabilidade dos sucos (DUVETTER et al., 2009). Dessa forma, a inativação dessas enzimas é necessária para evitar a perda de qualidade e estender a vida útil de produtos de frutas e hortaliças (CHAKRABORTY et al., 2014).

Algumas enzimas, como a peroxidase, são resistentes ao calor, necessitando de temperaturas muito elevadas e tempo de tratamento muito alto para que sua inativação total ou parcial seja alcançada. No entanto, sabe-se que tratamentos térmicos mais severos levam a perdas de compostos nutricionais e alterações sensoriais consideráveis. Com isso, novos métodos precisam ser explorados a fim de inativar essas enzimas sem causar danos às características do produto.

5. Alta pressão isostática (API)

A demanda por alimentos naturais, sem conservantes, mais saborosos e saudáveis aumentou nos últimos anos. Diante disso, a indústria de alimentos desenvolveu tecnologias emergentes de processamento, dentre as quais destaca-se a utilização de Alta Pressão Isostática - API ou hidrostática (do inglês *High Hydrostatic Pressure - HHP*), a qual é capaz de originar produtos microbiologicamente seguros e com suas características preservadas (RODRÍGUEZ et al., 2012).

Os primeiros estudos envolvendo a tecnologia de alta pressão foram realizados por Hite (1899), demonstrando que a vida útil do leite cru podia ser estendida por 4 dias após uma hora de pressurização a 600 MPa à temperatura ambiente. No entanto, somente na década de 1980, no Japão, que o primeiro produto processado por alta pressão chegou ao mercado (MUJICA-PAZ et al., 2011).

O processamento por API consiste em submeter o produto à pressão isostática de até 1.000 MPa (equivalentes a 10.000 atmosferas) durante um tempo de processo determinado em temperatura controlada (KNNOR, 1999). A alta pressão isostática possui dois princípios científicos que devem ser considerados para sua aplicação no processamento de alimentos, o princípio de *Le Chatelier* e o isostático.

O princípio de *Le Chatelier* afirma que quando um sistema em equilíbrio é perturbado, o mesmo responde de uma maneira que tende a minimizar essa perturbação (NORTON; SUN, 2008). Qualquer fenômeno seja de transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química, acompanhado por uma diminuição no volume, é favorecido pelo aumento de pressão. O processo a API estimula reações que resultam em uma diminuição no volume, pois o material é comprimido cerca de 15% a uma pressão de 600 MPa (SUN, 2014).

O princípio isostático determina que a pressão é instantaneamente e uniformemente distribuída ao longo da amostra independente do tamanho e da geometria do produto. No entanto, isso só acontece se a amostra estiver em contato direto com o meio de pressão ou hermeticamente fechada em embalagem flexível que permita a transmissão da pressão (NORTON; SUN, 2008). O tempo de processamento sob pressão é, portanto, independente do tamanho da amostra, ao contrário do que acontece no processamento térmico (KOUTCHMA, 2014).

A aplicação dessa tecnologia em alimentos torna-se vantajosa devido a sua eficácia na inativação microbiológica e enzimática, além de poder manter os principais

atributos de qualidade, como frescor, valor nutricional e propriedades sensoriais, uma vez que a API afeta principalmente ligações não covalentes (ligações de hidrogênio, ligações iônicas e ligações hidrofóbicas). Devido ao baixo impacto sobre ligações covalentes, a API exerce efeitos limitados em moléculas pequenas, com isso, aminoácidos, vitaminas, compostos antioxidantes, moléculas de sabor, e outros compostos de baixo peso molecular são raramente afetados (RODRÍGUEZ et al., 2012; BARBA et al., 2015).

Chen et al. (2015) observaram que o teor de fenóis totais não foi afetado, ou apresentou um ligeiro aumento, em amostras de uma bebida de mamão tratadas por API em comparação com amostras não tratadas. O aumento se deve, segundo Queiroz et al. (2010), ao fato de que os fenóis estão presentes nos vacúolos das plantas e o tratamento por API pode romper a membrana que recobre os vacúolos, aumentando a extratabilidade de compostos antioxidantes, fazendo com que o teor de fenóis totais também aumente. Por outro lado, o teor de fenóis totais diminuiu significativamente após o tratamento térmico (alta temperatura por curto período de tempo - 110 °C/8,6 s), mostrando que a API é uma alternativa promissora para o processamento de bebida de mamão em alternativa ao tratamento térmico (CHEN et al., 2015).

Os efeitos da API sobre a inativação microbiana já estão bem estabelecidos, sendo que uma pressurização a 580 MPa por 3 minutos, a temperatura ambiente, é equivalente ao tratamento térmico de pasteurização para produtos de baixa acidez (FDA, 2010). No entanto, o efeito antimicrobiano da alta pressão é dependente de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como condição fisiológica do micro-organismo, matriz e composição dos alimentos (HAYMAN; ANANTHESWARAN; KNABEL, 2007; MUJICA-PAZ et al., 2011; RENDUELES et al., 2011).

Além da atividade microbiológica, a atividade enzimática é outro parâmetro importante que afeta a qualidade dos alimentos, principalmente, de produtos de frutas e hortaliças. Nos vegetais intactos, as enzimas estão geralmente dentro dos compartimentos celulares do tecido vegetal. No entanto, quando esses produtos são cortados e/ou triturados ocorre a descompartimentalização dos tecidos, fazendo com que enzimas e substratos entrem em contato, causando assim alterações indesejáveis aos produtos (SUN, 2014).

O efeito da alta pressão sobre a atividade enzimática é variável, dependendo da pressão. A pressão pode afetar a conformação estrutural das enzimas e, conseqüentemente, levar a perda de atividade (pressões acima de 400 MPa) ou então,

em pressões mais baixas (até 200 MPa), pode ocorrer ativação das enzimas, devido a exposição de sítios que antes não estavam disponíveis para reação (SUN, 2014; TRIBST et al., 2016). No entanto, isso vai depender da matriz alimentar e do quanto a enzima é baroresistente.

Tribst et al. (2016) avaliaram os efeitos da API (600 MPa durante 5 ou 30 min a 25 °C) sobre a atividade de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em diferentes fontes vegetais (inhame, mandioquinha-salsa e batata-doce) processados de diferentes formas (cubos, purê e extrato enzimático), e observaram que a fonte e a matriz vegetal são de grande importância na eficácia da pressurização na inativação enzimática. Como exemplo, os autores obtiveram até 100 % de inativação da PPO no extrato de mandioquinha-salsa. Em contrapartida, no purê de batata-doce ocorreu até 368 % de ativação dessa mesma enzima.

A transmissão da pressão é momentânea e uniforme por toda a amostra, o tempo e a energia de processamento são reduzidos e o risco de tratamento excessivo em algumas partes de produtos volumosos são evitados (BARBA et al., 2015), não havendo também o "ponto frio", grande problema dos alimentos submetidos ao tratamento térmico.

Portanto, a tecnologia de alta pressão possui uma boa perspectiva para uso na indústria de alimentos como uma alternativa ao tratamento térmico (CHEN et al., 2015), gerando produtos com menores alterações de suas características sensoriais e nutricionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H.; MUÑOZ, M. D. C. C.; LERMA, L. L.; MONTORO, B. P.; BOCKELMANN, W.; PICHNER, R.; KABISCH, J.; CHO, G. S.; FRANZ, C. M. A. P.; GÁLVEZ, A.; BENOMAR, N. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. **Food Research International**, v. 78, p. 465-481, 2015.

AIJN. Associação Europeia de Sucos de Frutas. **Relatório de mercado de 2015**.

Disponível em:

<http://www.citrusbr.com/imgs/biblioteca/AIJN2015_Report_10062015_PT_06.pdf>

Acesso em: 28 de julho de 2018.

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; WRIGHT, A. V. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 351-354, 1999.

ALTERMANN, E.; RUSSELL, W. M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B. L.; MCAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, p. 3906-3912, 2005.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p.145-54, 2004.

ARAI, S.; OSAWA, T.; OHIGASHI, H.; YOSHIKAWA, M.; KAMINOGAWA, S.; WATANABE, M.; OGAWA, T.; OKUBO, K.; WATANABE, S.; NISHINO, H.; SHINOHARA, K.; ESASHI, T.; HIRAHARA, T. A Mainstay of Functional Food Science in Japan - History, Present Status, and Future Outlook. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2001.

BAGCHI, T. Traditional food & modern lifestyle: Impact of probiotics. **Indian Journal of Medical Research**, v. 140, p. 333-335, 2014.

BARBA, F. J.; TEREFE, N. S.; BUCKOW, R.; KNORR, D.; ORLIEN, V. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. **Food Research International**, v. 77, p. 725-742, 2015.

BATTISTINI, C.; GULLÓN, B.; ICHIMURA, E. S.; GOMES, A. M. P.; RIBEIRO, E. P.; KUNIGK, L.; MOREIRA, J. U. V.; JURKIEWICZ, C. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 303-309, 2018.

BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, p. 160-174, 2012.

BINNS, N. **Probioticos, prebioticos e a microbiota intestinal**. Belgica: ILSI Europe. 2013. 42p.

BLAIOTTA, G.; GATTA, B. L.; CAPUA, M. D.; LUCCIA, A. D.; COPPOLA, R.; APONTE, M. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. **Food Microbiology**, v. 36, p. 161-169, 2013.

BORGES, S.; BARBOSA, J.; SILVA, J.; GOMES, A. M.; PINTADO, M.; SILVA, C. L. M.; MORAIS, A. M. M. B.; TEIXEIRA, P. A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 381-388, 2016.

BRASIL. 1999a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, Brasília, DF, 03 maio, 1999.

BRASIL. 1999b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 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**, Poder executivo, Brasília, DF, 03 maio, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto nº 6.871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, 2009.

BROECKX, G.; VANDENHEUVEL, D.; CLAES, I. J. J.; LEBEER, S.; KIEKENS, F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, p. 303-318, 2016.

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

BULTOSA, G. Functional foods: dietary fibers, prebiotics, probiotics, and synbiotics. In: WRIGLEY, C.; CORKE, H.; SEETHARAMAN, K.; FAUBION, J. 2 ed. **Encyclopedia of food grains: the world of food grains**. Academic Press, 2016. p. 11-16.

CEAPA, C.; DAVIDS, M.; RITARI, J.; LAMBERT, J.; WELS, M.; DOUILLARD, F. P.; SMOKVINA, T.; VOS, W. M.; KNOL, J.; KLEEREBEZEM, M. The variable regions of *Lactobacillus rhamnosus* genomes reveal the dynamic evolution of metabolic and host-adaptation repertoires. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 1889-1905, 2016.

CHAKRABORTY, S.; KAUSHIK, N.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. High-pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 578-596, 2014.

CHEN, D.; PANG, X.; ZHAO, J.; GAO, L.; LIAO, X.; WU, J.; LI, Q. Comparing the effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on papaya beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 16-28, 2015.

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

CLAESSON, M. J.; SINDEREN, D. V.; O'TOOLE, P. W. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 269, p. 22-28, 2007.

- COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 591, n. 1-2, p. 276-289, 2005.
- COSTA, G. M.; SILVA, J. V. C.; MINGOTTI, J. D.; BARAO, C. E.; KLOSOSKI, S. J.; PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 195-201, 2017.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
- DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 1-27, 1999.
- DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; SHERWOOD, L. G. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 34, p. 483-498, 2005.
- DORON, S.; SNYDMAN, D. R. Risk and safety of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. 129-134, 2015.
- DUVETTER, T.; SILA, D. N.; BUGGENHOUT, S. V.; JOLIE, R.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I—Stability and Catalytic Activity of Pectinases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 75-85, 2009.
- EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges. **International Journal of Molecular Science**, v. 15, n. 3, p. 4158-4188, 2014.
- FAO/WHO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization). **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.
- FARAONI, A. S.; RAMOS, A. M.; GUEDES, D. B.; PINTO, M. R. M. R. Propriedades reológicas de sucos mistos de manga, goiaba e acerola adicionados de fitoquímicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 21-28, 2013.
- Food and Drug Administration (FDA) (2010). **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies - high pressure processing**. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ucm100158.htm>. Acesso em: 28 de agosto de 2018.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 2006, 602p.

GIALAMAS, H.; ZINOVIADOU, K. G.; BILIADERIS, C. G.; KOUTSOUMANIS, K. P. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, v. 43, n. 10, p. 2402-2408, 2010.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480-487, 2010.

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

GRANATO, D.; NAZZARO, F.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; CRUZ, A. G. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. **Reference Module in Food Science**, p. 1-7, 2018.

HAMMES, W. P. VOGEL, R. F. **The genus *Lactobacillus***. WOOD, B. J. N.; HOLZAPFEL, W. H. N. (Eds.), The genera of lactic acid bacteria, Chapman & Hall, New York, p. 19-54, 1995.

HAUKIOJA, A. Probiotics and oral health. **European Journal of Dentistry**, v. 4, p. 348-355, 2010.

HAYMAN, M. M.; ANANTHESWARAN, R. C.; KNABEL, S. J. The effects of growth temperature and growth phase on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in whole milk subject to high pressure processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 220-226, 2007.

HITE, B. H. The Effect of Pressure in the Preservation of Milk. **West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletins**. v. 58, p. 15-35, 1899.

JABBAR, S.; ABID, M.; HU, B.; WU, T.; HASHIM, M. M.; LEI, S.; ZHU, X.; ZENG, X. Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 16-21, 2014.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 216-222, 2012.

JHA, S. N.; GUNASEKARAN, S. Authentication of sweetness of mango juice using Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 337-342, 2010.

KAUR, G.; AGGARWAL, P. Effect of thermal processing and chemical preservatives on the physicochemical and phytochemical parameters of carrot juice. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2016.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H. S.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927-939, 2018.

KHALIL, A. W.; ALI, J.; PARACHA, G. M.; IMAN, S.; HASSAN, S. Effect of heat treatments on some quality parameters of carrot (*Daucus carota* L.) juice. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 10, n. 1, p. 55-59, 2015.

KLAENHAMMER, T. R.; DE VOS, W. M. **An incredible scientific journey. The evolutionary tale of the lactic acid bacteria.** LEDEBOER, A.; HUGENHOLTZ, J.; KOK, J.; KONINGS, W.; WOUTERS, J. (Eds.), The 10th LAB symposium. Thirty years of research on lactic acid bacteria, 24 Media Labs (2011), pp. 1-11

KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P.; BERNARD, E.; ROLAIN, T.; ZHOU, M.; SIEZEN, R. J.; BRON, P. A. The extracellular biology of the lactobacilli. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 199-230, 2010.

KNNOR, D. Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.5, p. 485-491, 1999.

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, p. 329-347, 2008.

KONAR, N.; PALABIYIK, I.; TOKER, O. S.; POLAT, D. G.; KELLECI, E.; PIROUZIAN, H. R.; AKCICEK, A.; SAGDIC, O. Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 206-213, 2018.

KOUTCHMA, T. **Adapting high hydrostatic pressure (HPP) for food processing operations.** Academic Press, 2014.

KUMAR, M.; NAGPAL, R.; VERMA, V.; KUMAR, A.; KAUR, N.; HEMALATHA, R.; GAUTAM, S. K.; SINGH, B. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 1, p. 23-34, 2013.

LAAKSO, K.; KOSKENNIEMI, K.; KOPONEN, J.; KANKAINEN, M.; SURAKKA, A.; SALUSJÄRVI, T.; AUVINEN, P.; SAVIJOKI, K.; NYMAN, T. A.; KALKKINEN, N.; TYNKKYNEN, S.; VARMANEN, P. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 746-766, 2011.

LUNA, R. A.; FOSTER, J. A. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 35-41, 2015.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.

MANTEGAZZA, C.; MOLINARI, P.; D'AURIA, E.; SONNINO, M.; MORELLI, L.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 63-72, 2018.

- MARTÍNEZ-FLORES, H. E.; GARNICA-ROMO, M. G.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; POKHREL, P. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. **Food Chemistry**, v. 172, p. 650-656, 2015.
- MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JUNIOR, B. R. C. Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 36, p. 540-548, 2016.
- MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J. M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764-770, 2013.
- MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; OLIVEIRA, P. M.; STRINGHETA, P. C. Minimally processed fruit salad enriched with *Lactobacillus acidophilus*: Viability of anti-browning compounds in the preservation of color. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 24, p. 2022-2027, 2015.
- MATHEYAMBATH, A. C.; SUBRAMANIAN, J.; PALIYATH, G. Mangoes. **Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health**, p. 641-645, 2016. doi: 10.1016 / B978-0-12-384947-2.00442-6
- MAURO, C. S. I.; GUERGOLETTO, K. B.; GARCIA, S. Development of blueberry and carrot juice blend fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92. **Beverages**, v. 2, n. 32, p. 1-11, 2016.
- MÚJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; SAMSON, C. T.; WELTI-CHANES, J.; TORRES, A. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 969-985, 2011.
- MÜLLER, A.; BRIVIBA, K.; GRÄF, V.; GREINER, R.; HERRMANN, C.; KUBALLA, T.; STAHL, M. R. UV-C treatment using a Dean vortex technology — impact on apple juice enzymes and toxicological potential. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 238-243, 2013.
- NARESH, K.; VARAKUMAR, S.; VARIYAR, P. S.; SHARMA, A.; REDDY, O. V. S. Enhancing antioxidant activity, microbial and sensory quality of mango (*Mangifera indica* L.) juice by γ -irradiation and its in vitro radioprotective potential. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4054-4065, 2015.
- NEMATOLLAHI, A.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49-53, 2016.
- NGUYEN, T. D. T.; KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 358-361, 2007.

NORTON, T.; SUN, D. W. Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, p. 2-34, 2008.

OLIVEIRA, P. M.; RAMOS, A. M.; MARTINS, E. M. F.; VIEIRA, É. N. R.; SOARES, A. S.; NORONHA, M. C. Comparison of vacuum impregnation and soaking techniques for addition of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to minimally processed melon. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 12, p. 2547-2554, 2017.

OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; E MARTÍN BELLOSO, O. Stability of health-related compounds in plant foods through the application of non thermal processes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, p. 111-123, 2012.

PARENTE, E.; CIOCIA, F.; RICCIARDI, A.; ZOTTA, T.; FELIS, G. E.; TORRIANI, S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 270-279, 2010.

PEREIRA, G. V. M.; COELHO, B. O.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. I.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, *in press*, 2018.

PICOUET, P. A.; SÁRRAGA, C.; COFÁN S.; BELLETTI N.; GUÀRDIA, M. D. Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 920-926, 2015.

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

PRADO, F. C.; LINDNER, J. D.; INABA, J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BRAR, S. K.; SOCCOL, C. R. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 489-497, 2015.

QUEIROZ, C.; MOREIRA, C. F. F.; LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Effect of high hydrostatic pressure on phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity in cashew apple juice. **High Pressure Research**, v. 30, n. 4, p. 507-513, 2010.

QUEIROZ, E. C. Q.; MENEZES, H. C. Suco de Laranja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.) **Bebidas não alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blücher, 2010, p. 243-267.

RAES, K.; KNOCKAERTA, D.; STRUIJSC, K.; CAMP, J. V. Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and antinutritional factors in the plant. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, p. 32-41, 2014.

- RANADHEERA, C. S.; VIDANARACHCHI, J. K.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G.; AJLOUNI, S. Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. **Fermentation**, v. 3, n. 67, p. 1-17, 2017.
- REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 22-34, 2008.
- RENDUELES, E.; OMER, M. K.; ALVSEIKE, O.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R.; PRIETO, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1251-1260, 2011.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.
- ROBERTS, D.; REYES, V.; BONILLA, F.; DZANDU, B.; LIU, C.; CHOULJENKO, A.; SATHIVEL, S. Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 144-150, 2018.
- RODRÍGUEZ, Y. M.; MUNIZ, C. A.; OLIVAS, G. I.; BELTRÁN, J. G.; ALIAGA, D. R.; SEPÚLVEDA, D. R. High Hydrostatic Pressure Processing of Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p. 399-416, 2012.
- ROSALES-MENDOZA, S.; ANGULO, C.; MEZA, B. Food-Grade Organisms as Vaccine Biofactories and Oral Delivery Vehicles. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 124-136, 2016.
- SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; OLIVEIRA, R. P. S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds.). **Lactic acid bacteria**. Marcel Decker, New York, 1993, 442p.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SANTOS FILHO, A. L.; FREITAS, H. V.; RODRIGUES, S.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. O.; GOMES, W. F.; NARAIN, N.; PEREIRA, A. L. F. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 371-378, 2019.
- SAVEDBOWORN, W.; NIYOMRAT, S.; NAKNOVN, J.; PHATTAYAKORN, K. Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 6, p. 463-469, 2017.

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

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 & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 279-284, 2007.

SHORI, A. B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 423-431, 2015.

SIEZEN, R. J.; TZENEVA, V. A.; CASTIONI, A.; WELS, M.; PHAN, H. T. K.; RADEMAKER, J. L. W.; STARRENBURG, M. J.; KLEEREBEZEM, M.; MOLENAAR, D.; VLIEG J. E. V. H. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strain isolated from various environmental niches. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 758-773, 2010.

SILVA, M.; JACOBUS, N. V.; DENEKE, C.; GORBACH, S. L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 8, p. 1231-1233, 1987.

SINCONGEL. Sindicato da indústria alimentar de congelados, supercongelados, sorvetes, concentrados e liofilizados no estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.sicongel.org.br/arquivos/Dadosestatisticosdosetor20142015.pdf>> Acesso em: 28 de abril de 2016.

SOCOL, C. R.; PRADO, M. R. M., GARCIA, L. M. B.; RODRIGUES, C.; MEDEIROS, A. B. P.; THOMAZ-SOCOL, V. Current developments in probiotics. **Journal of Microbiology, Biochemistry and Technology**, v. 7, p. 11-20, 2015.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33-49, 2017.

SUN, Z.; HARRIS, H. M. B.; MCCANN, A.; GUO, C.; ARGIMÓN, S.; ZHANG, W.; YANG, X.; JEFFERY, I. B.; COONEY, J. C.; KAGAWA, T. F.; LIU, W.; SONG, Y.; SALVETTI, E.; WROBEL, A.; RASINKANGAS, P.; PARKHILL, J.; REA, M. C.; O'SULLIVAN, O.; RITARI, J.; DOUILLARD, F. P.; ROSS, R. P.; YANG, R.; BRINER, A. E.; FELIS, G. E.; DE VOS, W. M.; BARRANGOU, R.; KLAENHAMMER, T. R.; CAUFIELD, P. W.; CUI, Y.; ZHANG, H.; O'TOOLE; P. W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, n. 8322, p. 1-13, 2015.

SUN, D. W. **Emerging technologies for food processing**. 2 ed. Academic Press, 2014. 653p.

TEE, E. S. **Functional foods in Asia current status and issues**. Singapore: International Life Sciences Institute, 2004. 49p.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. *Lactobacillus plantarum*: characterization of the species and application in food production. **Food Reviews International**, v. 26, p. 205-229, 2010.

TRIBST, A. A. L.; LEITE JUNIOR, B. R. C.; OLIVEIRA, M. M.; CRISTIANINI, M. High pressure processing of cocoyam, Peruvian carrot and sweet potato: Effect on oxidative enzymes and impact in the tuber color. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 302-309, 2016.

TRIPATHI, A. 2018. Global Probiotic Market to reach worth of US\$96 billion by 2020 End, Expanding Availability in Retail Stores and New Product Launches impart Momentum to Growth. **Transparency Market Research**, 06 June 2018. Disponível em: <<https://globenewswire.com/news-release/2018/06/06/1517768/0/en/Global-Probiotic-Market-to-reach-worth-of-US-96-billion-by-2020-End-Expanding-Availability-in-Retail-Stores-and-New-Product-Launches-impart-Momentum-to-Growth.html>> Acesso em: 27 de agosto de 2018.

TUR, J. A.; BIBILONI, M. M. Functional Foods. In: **Encyclopedia of Food and Health**, 2016, p. 157-161. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00340-8

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for *Lactobacillus acidophilus*: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 136-146, 2017.

VANAJAKSHI, V.; VIJAYENDRA, S. V. N.; VARADARAJ, M. C.; VENKATESWARAN, G.; AGRAWAL, R. Optimization of a probiotic beverage based on Moringa leaves and beetroot. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1268-1273, 2015.

VASCONCELOS, B. G.; MARTINEZ, R. C. R.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Innovative Açai (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 1843-1849, 2014.

VIJAYENDRA, S. V. N.; HALAMI, P. M. Health Benefits of Fermented Vegetable Products. In: TAMANG, J. P. **Health Benefits of Fermented Foods and Beverages**. Boca Raton: CRC Press, 2015, 325p.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; TEIXEIRA, F. C. **Alimentos Funcionais: Conceitos Básicos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010, 20p.

VUKASOVIĆ, T. Functional foods in line with young consumers: challenges in the marketplace in Slovenia. BAGCHI, D.; NAIR, S. (Ed.). In. **Developing New Functional Food and Nutraceutical Products**. . Cap. 20, p. 391-405, 2017.

WANG, J.; HU, X.; WANG, Z. Kinetics models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM14558(T) and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922(T) in apple juice by ultrasound. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 177-181, 2010.

ZHANG, Q.; WU, Y.; FEI, X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, p. 571-580, 2016.

ZHANG, Y.; LIU, X. C.; WANG, Y.; ZHAO, F.; SUN, Z.; LIAO, X. Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 135-144, 2016.

CAPÍTULO 2

Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli

Abstract

This study evaluated the physico-chemical properties and the viability of *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* in mango and carrot mixed juices. In addition, this study verified the resistance of *L. plantarum* (bacteria that presented greater viability) to the gastrointestinal tract simulated *in vitro*. Aliquots of 3 different formulations (varying the concentration of pulps) containing the previously inoculated probiotics (37 °C/24h) were added to the respective formulations and products were stored at 8 °C for 35 days. No difference was found in the total soluble solids and color of the products. A reduction in pH and an increase in acidity were observed in all samples during storage, probably due to the fermentative action of probiotics. The increase of carrot concentration in mixed juice formulations promoted greater viability for the microorganisms. During the 35-day shelf life, all mixed juices supplemented with *L. plantarum* maintained counts above 7 Log CFU/mL after *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions. Mixed juice of mango and carrot showed to be as a good vehicle for probiotic bacteria and meets the needs of consumers looking for functional, healthy and low-sugar mixed juices.

Key-words: Mixed juice; carrot; mango; probiotics; gastrointestinal digestion *in vitro*.

1. Introduction

Interest in the development of novel functional foods and their incorporation into a healthy diet has been growing in recent years. Among these products, those containing probiotic microorganisms have gained importance, since these bacteria promote a beneficial effect on host health and have potential for prevention of various diseases (Kandylis, Pissaridi, Bekatorou, Kanellaki, & Koutinas, 2016). Probiotics help maintain balance and stability of the gut microbiota, contributing to digestive functions, such as constipation control, nutritional bioavailability and modulation of digestive and immune system activity. These microorganisms have potential health effects related to cancer, antibiotic-associated diarrhea, travelers' diarrhea allergies, lactose intolerance, high blood pressure and cholesterol, immune system function, and vitamin production (Rostami, Mousavi, Mousavi, & Shahsafi, 2018).

The demand for new food matrices as a vehicle for probiotics in alternative to dairy products is increasing due to intolerance and allergy to milk derivatives from part of the population, increase of individuals who adhere to vegetarianism, cholesterol-restricted diets, among other factors (Martins et al., 2013; Aboufazli, Shori, & Baba, 2016). Thus, the use of the vegetable matrix has been widely discussed as an alternative for the incorporation of probiotic bacteria in the diet, since fruits and vegetables contain nutrients for the growth of these microorganisms without offering consumers the inconveniences related to dairy products (Martins, Ramos, Martins, & Leite Junior, 2016; Shori, 2016).

Many studies were carried out using the vegetable matrix as carrier of probiotic bacteria, such as carrot juice fermented by *Lactobacillus plantarum* (Li et al., 2016), minimally processed melon added *L. acidophilus* (Oliveira et al., 2017), orange juice added by *Lactobacillus casei* (Costa et al., 2017), rice extract fermented by *Lactobacillus plantarum* (Savedboworn, Niyomrat, Naknovn, & Phattayakornb, 2017), soybean extract fermented by *L. acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus* (Battistine et al., 2018), among others. In general, the viability of probiotic bacteria in vegetable products depends on several intrinsic and extrinsic factors, such as the species and bacterial strain used, pH, the presence of oxygen dissolved in the medium, the composition of the food, as well as storage temperature, the nature of the ingredients added and the food matrix (Shori, 2016).

In this context, the production of mixed juice may be a promising alternative to increase the viability of probiotic microorganisms and the sensory acceptance of the product, besides being an alternative to conventional dairy products (Antunes et al., 2013). Among the vegetables that have high production and industrial processing, mango and carrot stand out due to the low cost, high availability of nutrients and palatable flavor (Bonneau, Boulanger, Lebrun, Maraval, & Gunata, 2016; Kaur, & Aggarwal, 2016).

Mango (*Mangifera indica*) is a tropical fruit widely consumed in many parts of the world and is generally regarded by consumers as the "king of fruits" for its sweet taste, exotic flavor and succulence (Matheyambath; Subramanian; & Paliyath, 2016). The carrot (*Daucus carota* L.), besides being widely consumed *in natura* or as an ingredient in culinary recipes, originates the carrot juice, which is considered one of the most popular vegetable juices (Li et al., 2016). Mango and carrot are vegetables rich in functional components such as carotenoids, ascorbic acid, phenolic compounds, vitamins (A, D, B, E, C and K), fiber and minerals (calcium, potassium, phosphorus, sodium and iron) (Cadena et al., 2013; Kun, Rezessy-Szabó, Nguyen, & Hoschke, 2008). Although these vegetables attract consumers' attention, there are no studies that evaluate the combined effect of the mango and carrot matrices on the viability of probiotic bacteria, as well as is scarce the study of viability and resistance of the probiotic to the gastrointestinal tract (GTI) using mixed vegetable juice.

Thus, this study evaluated the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum* LP299V[®] and *Lactobacillus acidophilus* LA-14) and the physico-chemical characteristics of different formulations of mango and carrot mixed juice during 35 days at 8 °C. In addition, the resistance to GTI of the probiotic strain with greater viability in the mixed juice of the different formulations was evaluated.

2. Material and methods

2.1. Obtaining mango and carrot pulps

The mango pulp (*Mangifera indica* L. Ubá variety) was obtained from the company *Bela Ischia Ltda* (Astolfo Dutra, MG, Brazil) and kept frozen at -18 °C until preparation of mixed juices.

For obtaining carrot pulp (*Daucus carota* L.), fresh roots were obtained from the local market of the city of Rio Pomba (Minas Gerais, Brasil), washed in running water and sanitized in organic chlorine solution at 200 mg/L of active chlorine for 15 minutes at 5 °C. After the sanitization, the vegetables were rinsed in chlorinated solution at 20 mg/L for 5 minutes and then peeled and chopped with the aid of knives. The carrot juice was obtained by milling the roots with water, in the proportion of 1:1, in a domestic blender. Immediately after obtaining the carrot pulp, the mixed juice was formulated as described in item 2.2.

2.2. Preparation and processing of mango and carrot mixed juices

To prepare the formulations, both pulps were weighed and added with mineral water to a final concentration of 60 g of pulp/100 mL. Subsequently, the total soluble solids (TSS) was adjusted to 8 °Brix with the addition of commercial sucrose in all formulations to standardize the content of soluble solids in mixed juices. The sugar content added to the formulations ranged from 1.0 to 2.0 g/100 mL.

Three different formulations of mango and carrot mixed juice were tested, with formulation 1 (F1): 5 parts mango pulp and 1 part carrot pulp; formulation 2 (F2): 2 parts mango pulp and 1 part carrot pulp; and formulation 3 (F3): 1 part mango pulp and 1 part carrot pulp. The proportions of vegetable pulps were defined as equidistant concentrations, in which the amount of carrot never exceeded the mango quantity due to the mango being highly appreciated by the consumers, with low cost of production and widely produced compared to the carrot.

Aliquots of 100 mL of the mixed juices were filled into sterilized glass bottles with metal caps and pasteurized at 90 °C/1 min for further analysis (Faraoni, Ramos, Guedes, & Pinto, 2013). Pasteurization was carried out in a water bath and a thermocouple was added in the lower heating point on a control bottle containing juice to monitor the temperature. After pasteurization, the product was cooled to 10 °C with ice water and stored at 8 °C (Moreira et al., 2017).

2.3. Preparation and addition of probiotics in mixed juice

The preparation of probiotic cultures and added to the mixed juice was performed as Moreira et al. (2017), where, the pre-inoculum was prepared for each microorganism (*L. rhamnosus* GG (Culturelle®) (LGG), *L. plantarum* LP299V®

(Jamieson™ Natural Sources) (LP) and *L. acidophilus* LA-14 (Nature's Bounty®) (LA)) in each formulation (F1, F2, and F3), totaling 9 treatments (F1LGG; F2LGG; F3LGG; F1LP; F2LP; F3LP; F1LA; F2LA; F3LA). For this, after pasteurization, one *L. rhamnosus* and one *L. plantarum* capsule, containing 10^{10} cells each, and five *L. acidophilus* capsules, containing 2×10^9 cells each, were added aseptically and individually to 100 mL of each juice formulation. Then, the juices were manually stirred and incubated at 37 °C/24 h. The next day, 10 mL aliquots of the pre-inoculum were added to 90 mL of pasteurized mixed juice (Moreira et al., 2017). The products obtained were stored at 8 °C for 35 days and the analyzes were performed every 7 days. Figure 1 shows the experimental scheme.

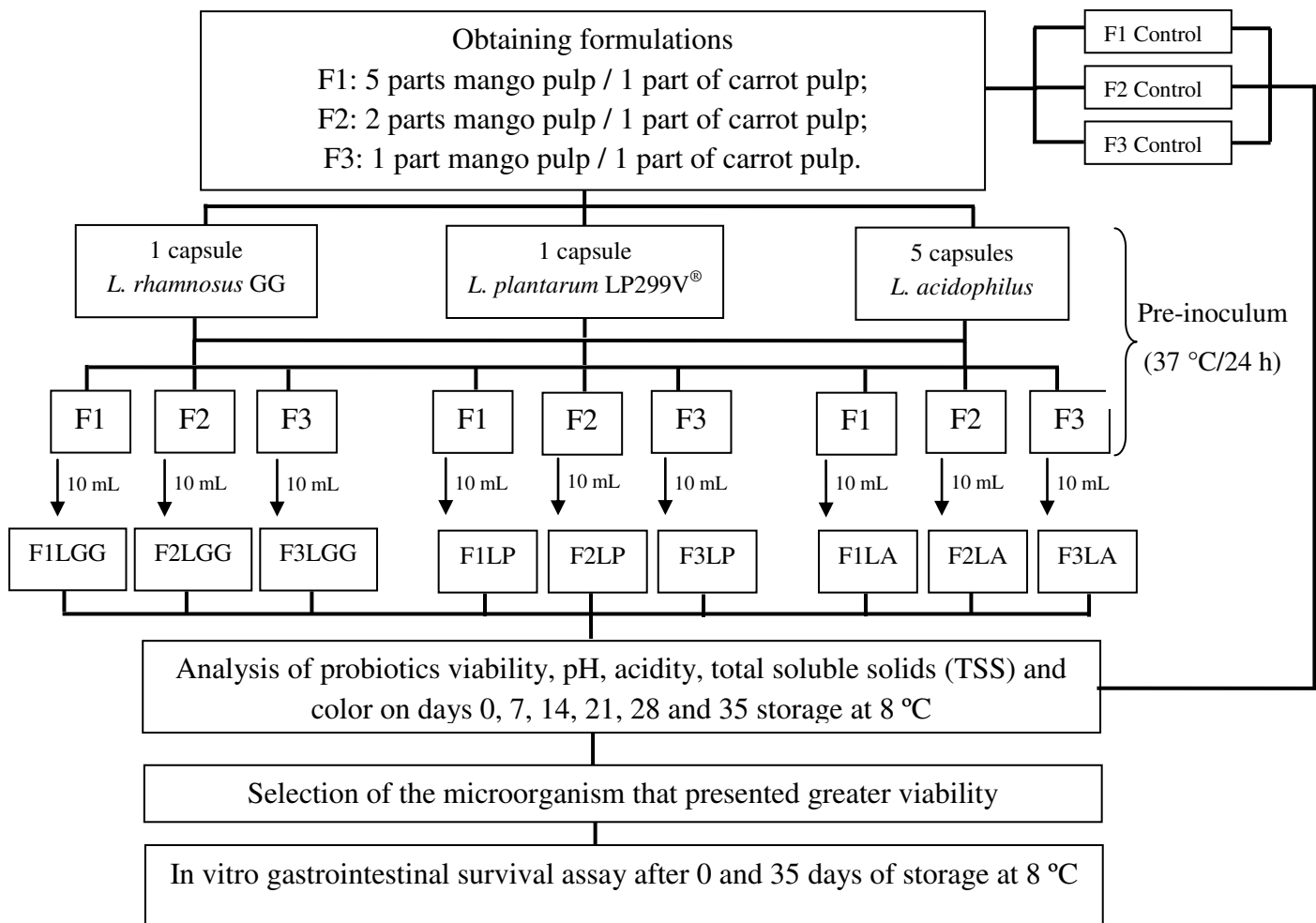


Figure 1. Scheme of the experiment.

As a control treatment, the three formulations of mango and carrot mixed juice were obtained without the addition of probiotic cultures. The control treatments were stored for 35 days at 8 °C and submitted the same analyzes of the other treatments.

2.4. Physical-chemical characteristics

Mango and carrot mixed juices were evaluated at times 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days of storage at 8 °C. Analyzes of pH, titratable acidity and TSS of mixed juices were carried out according to the AOAC methods: 920.92, 10.197 e 973.21, respectively (AOAC, 2000). For this, 10 g of each sample were weighed and 100 mL of distilled water added. The pH was determined by direct reading in potentiometer (mPA-210, MS TECNOPON, São Paulo, Brazil). For acidity determination, expressed as a percentage of citric acid (w/v), the juice was titrated with 0.1 mol/L NaOH standard solution until a final pH of 8.2-8.4 (titration endpoint) was reached. The TSS was performed with a direct reading on refractometer (Digital ABBE Refractometer WAY-2S, Quimis, Brazil) at 25 ° C, and the results were expressed in ° Brix.

The color of the mixed juices was measured using a Color Reader CR-10 (Minolta) colorimeter. The color measurements were performed by direct reading of reflectance of the L* a* and b* coordinates using the CIELAB L* scale. For each sample, three readings were taken at different random points of the product in order to obtain the mean result. The total color difference (ΔE) between the samples was measured according to Equation 1 (Adekunt, Tiwari, Cullen, Scannell, & O'Donnell, 2010). In each formulation, the mixed juice without addition of probiotic was arbitrarily defined as the reference.

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5} \quad 1$$

The total dietary fiber content was performed by the enzymatic-gravimetric method according to AOAC (2012). This method is based on sequential enzymatic digestion of the samples by α -amylase, protease and amyloglucosidase for hydrolysis of starch, proteins and amylose, respectively, followed by ethanol precipitation to obtain the soluble fiber and subsequent drying of the residue to obtain the insoluble fiber. The total dietary fiber content is the sum of the soluble and insoluble fractions of the product.

2.5. Viability of probiotic cultures in mango and carrot mixed juice

Aliquots of 25 mL of the mixed juices were homogenized in 225 mL of saline solution, obtaining the dilution 10^{-1} . Subsequently, serial dilutions were performed. The viability of *L. rhamnosus*, *L. plantarum* and *L. acidophilus* was carried out after 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days of mixed juices processing stored at 8 °C, by colony counting using pour plate method in Man, Rosa and Sharpe - MRS (Kasvi, Brazil) culture medium (Richter, & Vedamuthu, 2001). The plates were incubated at 37 °C for 72 hours. The control samples, not added to the probiotic microorganisms, were also submitted to the same test conditions. The results were expressed log CFU (colony forming units) per milliliter of the product.

2.6. Evaluation of the survival of the probiotic microorganism to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

For the *in vitro* assay, the microorganism that presented the highest viability was chosen and the 3 formulations (F1, F2 and F3) were evaluated for this microorganism, in order to evaluate the resistance of this probiotic to the gastrointestinal conditions and if the medium composition influenced their survival. The analysis was carried out after 0 and 35 days of the mixed juices processing stored at 8 °C.

The analysis was conducted using an *in vitro* model, through the simulation of gastric and enteric juices and enzymes of the gastrointestinal tract according to methodology proposed by Bedani, Rossi, & Saad (2013). Diluted aliquots of probiotic mixed juices were transferred to sterile glass vials and the pH was adjusted to 2.3-2.4 with 1 mol/L HCl. Pepsin (from porcine stomach mucosa, Sigma–Aldrich) and lipase (Amano lipase G, from *Penicillium camemberti*, Sigma–Aldrich) solutions were added to samples to reach a concentration of 3 g/L and 0.9 mg/L, respectively. Flasks were incubated at 37 °C, with agitation during 2 h, leading to the simulated gastric phase. Then, in enteral phase I, the pH was increased to 5.4-4.7 with alkaline solution [150 mL of 1 mol/L NaOH (Synth, Diadema, Brazil) and 14 g of $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Synth, Diadema, Brazil) and distilled water up to 1 L] containing bovine bile (Sigma-Aldrich) and pancreatin from porcine pancreas (Sigma-Aldrich) at a concentration of 10 g/L and 1 g/L, respectively. The samples were incubated again at 37 °C for 2 h under agitation. Finally, the simulation of the enteric phase II occurred. The pH was increased to 6.8–7.2

using the same alkaline solution, bile and pancreatin were adjusted to maintain the concentration of 10 g/L and 1 g/L, respectively, and the samples were incubated again at 37 °C for 2 h under agitation, and reaching 6 h of assay.

The enumeration of the probiotic microorganisms surviving the gastrointestinal conditions was carried out after the end of each phase (2 h = gastric phase (GP), 4 h = enteric phase I (EP I) and 6 h = enteric phase II (EP II)) and viability was carried out according to item 2.5.

2.7. Statistical analysis

Each sample treatment was carried out in triplicate with three determinations per analysis. Data was analyzed via Analysis of variance (ANOVA) using the STATISTICA 7.0 software (StatiSoft, Inc., Tulsa, Okla., U.S.A.). Tukey test was used to determine the differences among the treatment means at the 95% confidence level when appropriate. Data was represented as the mean \pm standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. pH, acidity and viability of probiotics in the pre-inoculum of mango and carrot mixed juices

There was a significant effect of the microorganisms on pH reduction and acidity increase of the juices in the pre-inoculum after 24 hours of incubation at 37 °C ($p < 0.05$) (Figure 2A and 2B). *L. plantarum* was the microorganism that showed the highest viability after 24 hours of incubation, independent of the formulation, except in formulation 3, which presented similar value with *L. rhamnosus* (Figure 2C).

L. plantarum has a good adaptability to different media being found in several ecological niches, as well as in the gastrointestinal tracts of humans and animals. (Siezen et al., 2010; Sabo, Vitolo, González, & Oliveira, 2014). This adaptability is associated with its ability to ferment a variety of sugars (Prins et al., 2010) and, due to a high efficiency in the transport system, quickly absorbs the necessary solutes (Salminen, & Von Wright, 1993).

The results show that there is a difference during the pre-inoculation fermentation in relation to the adaptation of probiotic cultures to the juice formulations, being *L. acidophilus* the bacterium of lower robustness. Other studies corroborate the

influence of the medium composition on the viability of different probiotic lactobacilli cultures (Betoret, Calabuig-Jiménez, Patrignani, Lanciotti, & Dalla Rosa, 2017; Espirito-Santo, Carlin, & Renard, 2015).

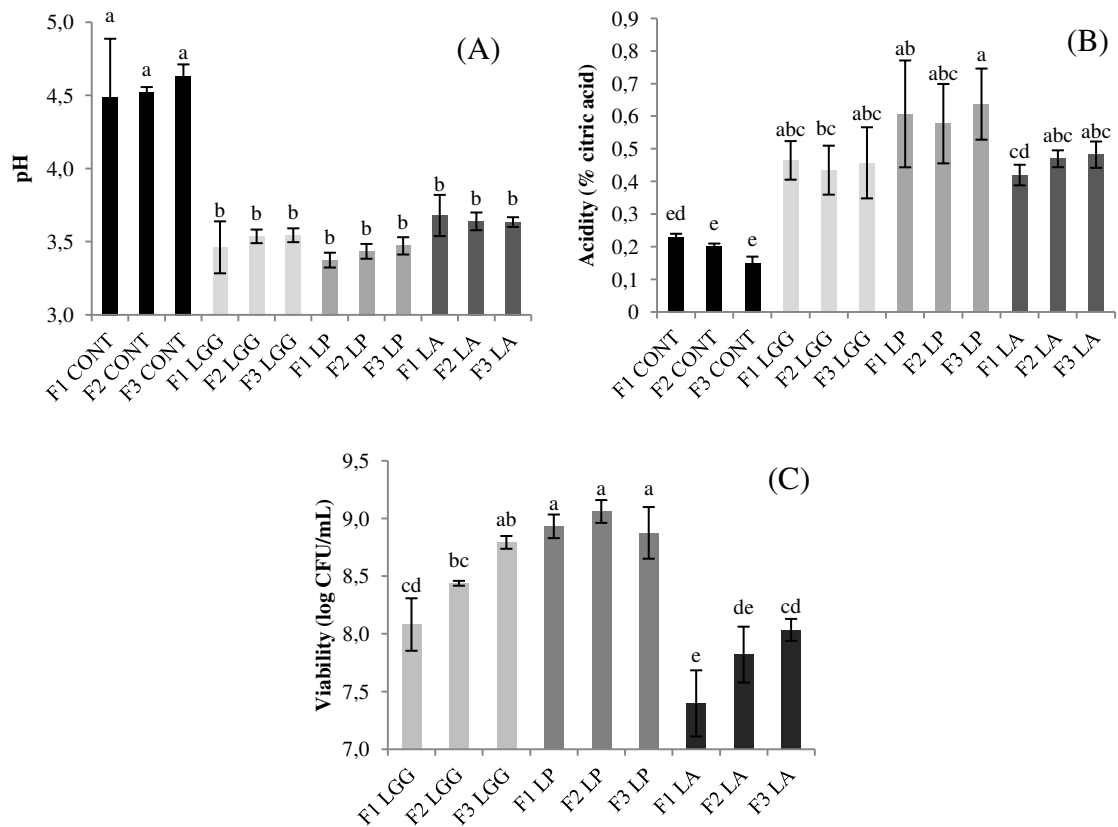


Figure 2. Evaluation of pH, acidity and viability of probiotic microorganisms in pre-inoculum after 24 h of incubation at 37 °C. CONT: without addition of probiotic microorganism. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among the treatments.

According to Sheehan, Ross, & Fitzgerald (2007), changes in pH and acidity may be useful to indicate the adaptation and growth of bacteria in different fruit juices. However, other factors should also be considered such as the chemical composition of juices, the balance between nutrients and inhibitory compounds and the ability of the strains to adapt to these matrices. Thus, *L. acidophilus* showed lower development compared to other microorganisms in the formulations prepared in this study, possibly because the environment conditions were not favorable to the development of this microorganism, such as low pH, presence of oxygen and low concentration of fermentable sugars by this microorganism.

Mixed juices of the control treatments showed counts lower than 1 log CFU/mL for the three formulations after processing, proving the effectiveness of the thermal treatment employed without any subsequent contamination of the product.

3.2. Physico-chemical characteristics of mango and carrot probiotic mixed juice

Figures 3 and 4 show the results obtained for the pH and acidity, respectively, of the mixed juices in the different formulations, added with the respective pre-inoculum containing the probiotic microorganisms.

In the comparative evaluation of the formulations without addition of probiotics, it was verified that formulation 3 had a higher pH value (Figure 3A) and a lower acidity value (Figure 4A) ($p < 0.05$), which is due to the increase in the amount of carrot pulp (pH 5.0) and to the decrease in the amount of mango pulp (pH 3.8). However, for the juice added to the probiotic microorganisms, this difference was minimized and for most of the evaluated days, there was no difference in the pH values between the formulations, independently of the added microorganism ($p > 0.05$) (Figures 3-4B, 3-4C and 3-4D).

Over time, the juices from the control treatments showed no change in pH and acidity ($p > 0.05$) (Figure 3 and 4A). On the other hand, the juices containing probiotics, with the exception of formulations 1 and 2 added by *L. acidophilus*, showed a reduction in pH throughout storage at 8 °C ($p < 0.05$) (Figure 3B, 3C and 3D). Similarly, an increase in acidity was observed in these juices, except for formulations containing *L. acidophilus*, during 35 days of storage at 8 °C ($p < 0.05$) (Figure 4B, 4C and 4D).

The pH reduction and acidity increase in juices is due to the production of acids by the added microorganisms, especially *L. plantarum* and *L. rhamnosus*, during refrigerated storage [where *L. plantarum* and *L. acidophilus* used sucrose, fructose and glucose as substrate present in juices (Gilliland & Speck, 1977; Hedberg, Hasslöf, Sjöström, Twetman, & Stecksén-Blicks, 2008), and *L. rhamnosus* used glucose and fructose (Hedberg, Hasslöf, Sjöström, Twetman, & Stecksén-Blicks, 2008)]. In contrast, *L. acidophilus*, which finished the pre-inoculation phase with lower viability, showed low adaptation in these matrices, justifying the slight change in the characteristics of the juice containing this bacterium.

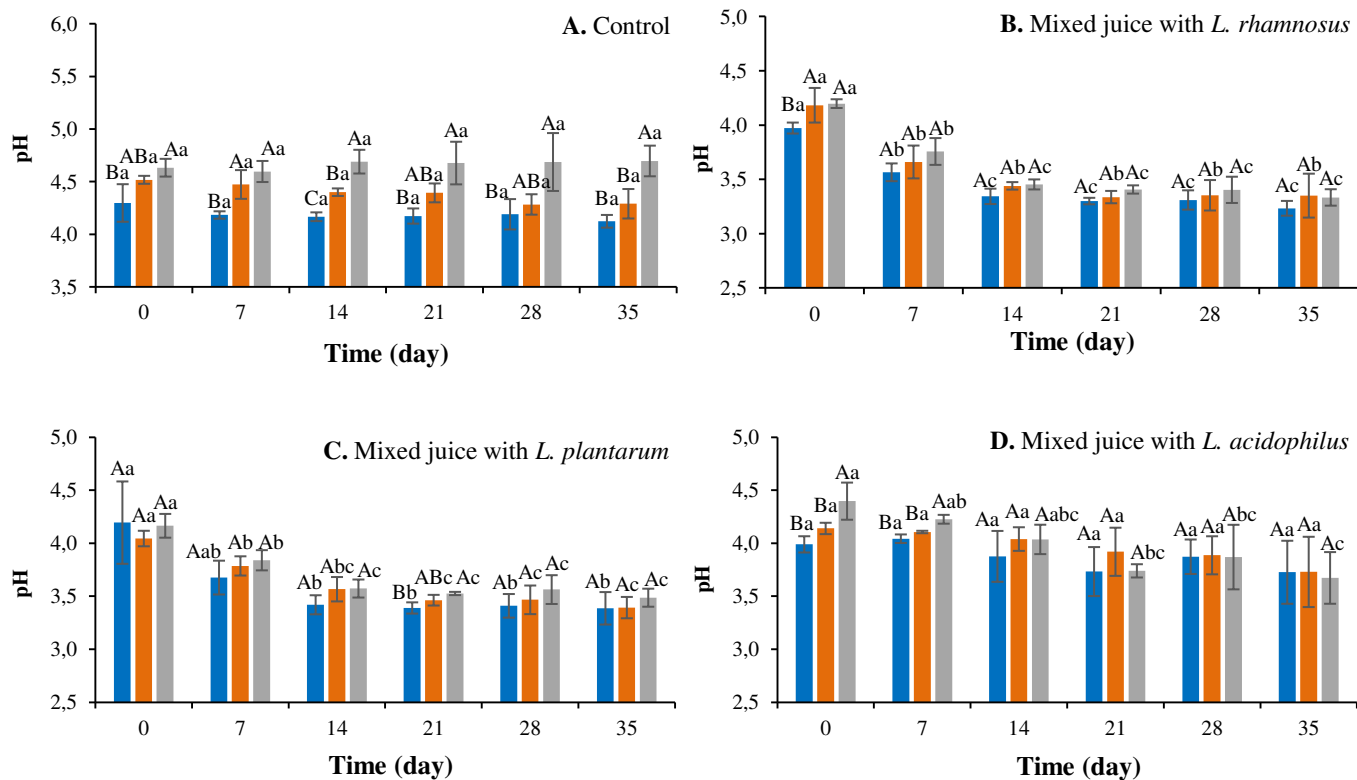


Figure 3. Evaluation of the pH of different formulations of probiotic mixed juices. F1_Mixed juice (■), F2_Mixed juice (■), F3_Mixed juice (■). Different upper case letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among the formulations at the same time and different lowercase letters indicate significant difference ($p < 0.05$) over time for each formulation.

Pimentel, Madrona, Garcia, & Prudencio (2015) verified that the addition of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* caused a slight increase in acidity as well as decreased pH levels in clarified apple juice during 28 days at 4 °C. These researchers reported that probiotic microorganisms may metabolize the simple sugars present in the juice and, consequently, produce small amounts of organic acids; or still, dead bacteria may be able to release enzymes that might have hydrolyzed the polysaccharides from the juice (Ding & Shah, 2008).

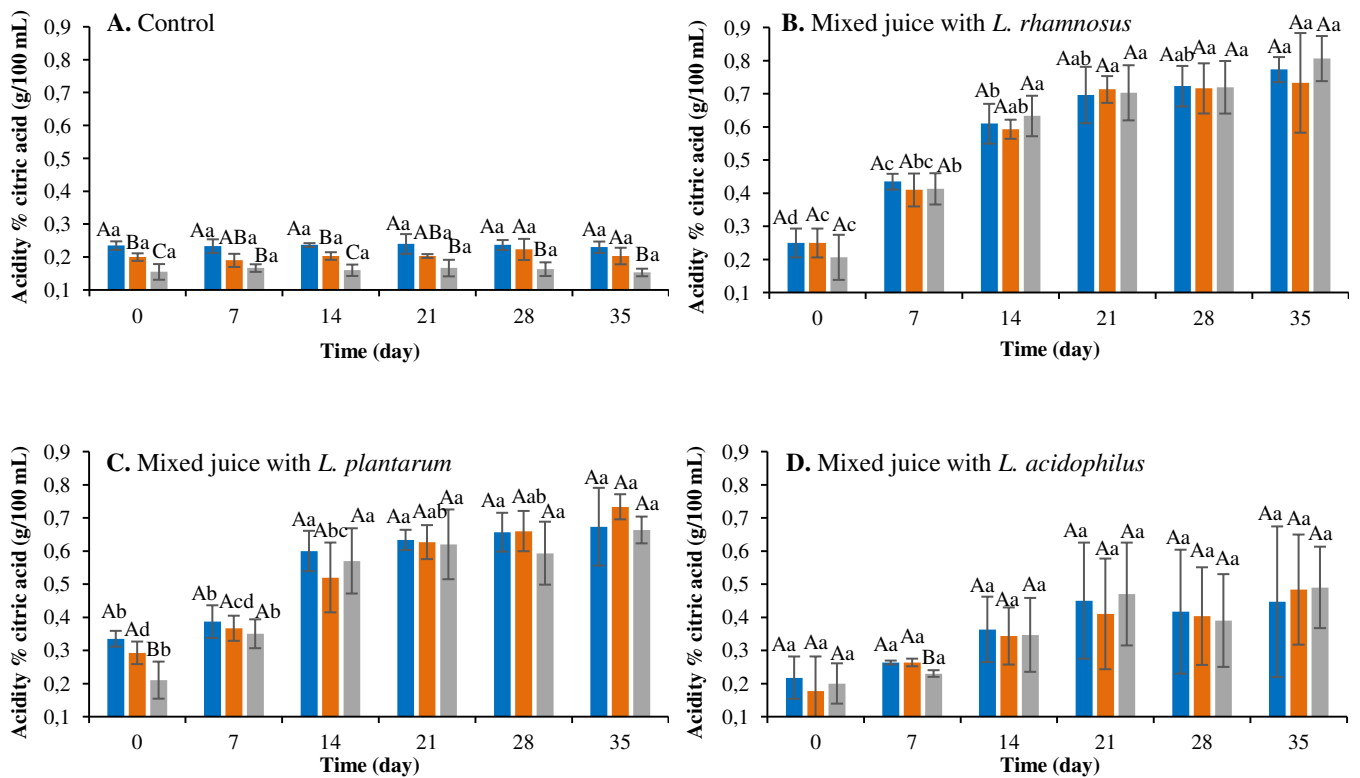


Figure 4. Evaluation of the acidity of the different formulations of probiotic mixed juices. F1_Mixed juice (■), F2_Mixed juice (■), F3_Mixed juice (■). Different upper case letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among the formulations at the same time and different lowercase letters indicate significant difference ($p < 0.05$) over time for each formulation.

There was no difference in total soluble solids (TSS) among the samples in each time evaluated ($p > 0.05$) and throughout the storage period ($p > 0.05$). After processing, the formulations 1, 2 and 3 showed an average of 7.9 ± 0.4 , 7.9 ± 0.3 , and 7.6 ± 0.4 °Brix, respectively ($p > 0.05$). After 35 days of storage, these values were 7.4 ± 0.3 , 7.5 ± 0.5 , and 7.3 ± 0.6 °Brix, respectively ($p > 0.05$), which demonstrates the stability of the product over the shelf life.

3.3. Color

No difference was observed in L^* , a^* and b^* parameters among the evaluated samples after the processing as well as during the storage period ($p > 0.05$). In general, formulations 1, 2 and 3 not added to probiotic microorganisms showed L^* values of

37.2 ± 2.1; 37.2 ± 1.8 and 36.7 ± 1.6, respectively; a* values of 9.6 ± 3.3; 12.2 ± 4.4 and 13.1 ± 4.3, respectively; and, finally, b* values of 19.6 ± 7.8; 19.7 ± 7.3 and 18.0 ± 7.1, respectively. In addition, the presence of probiotic microorganisms did not affect the L*, a* and b* values of the different formulations (p>0.05). Based on the a* and b* parameters, the samples were characterized by the coloration ranging from reddish orange to purple red. This coloration is justified by the presence of carotenoids, which is the main pigment present in the mango and carrot pulps.

Regarding the total color difference (ΔE), arbitrarily considering each formulation of the mixed juice without addition of probiotic as reference, it was verified that the juices containing *L. rhamnosus*, *L. plantarum* and *L. acidophilus* presented ΔE average of 0.9 ± 0.5; 1.3 ± 1.0 and 1.4 ± 0.6, respectively. The ΔE represents the visual perception of the human eye and considers the color changes perceived by consumers as: very visible change ($\Delta E > 3.0$), notable (1.5 < ΔE < 3.0) and no visible color change ($\Delta E < 1.5$) (Adekunte, Tiwari, Cullen, Scannell, & O'Donnell, 2010). In addition, according to Choi, Kim, & Lee (2002), only ΔE values greater than 2 correspond to visually perceptible color changes between two samples. Thus, regardless of the formulation, it is expected that the addition of probiotic microorganisms will not result in perceptible color change by the consumer.

3.4. Viability of probiotic microorganisms in mango and carrot mixed juices

Regardless of the microorganism evaluated, formulation 3 promoted greater viability of the added microorganisms, however, only for *L. rhamnosus* GG this difference was statistically significant (p<0.05) (Figure 5A). This result is possibly due to the higher dietary fiber content present in the formulation 3 (8.9 g/100 g) compared to the other formulations (7.1 g/100 g in the formulation 1 and 7.8 g/100 g in the formulation 2) (p<0.05).

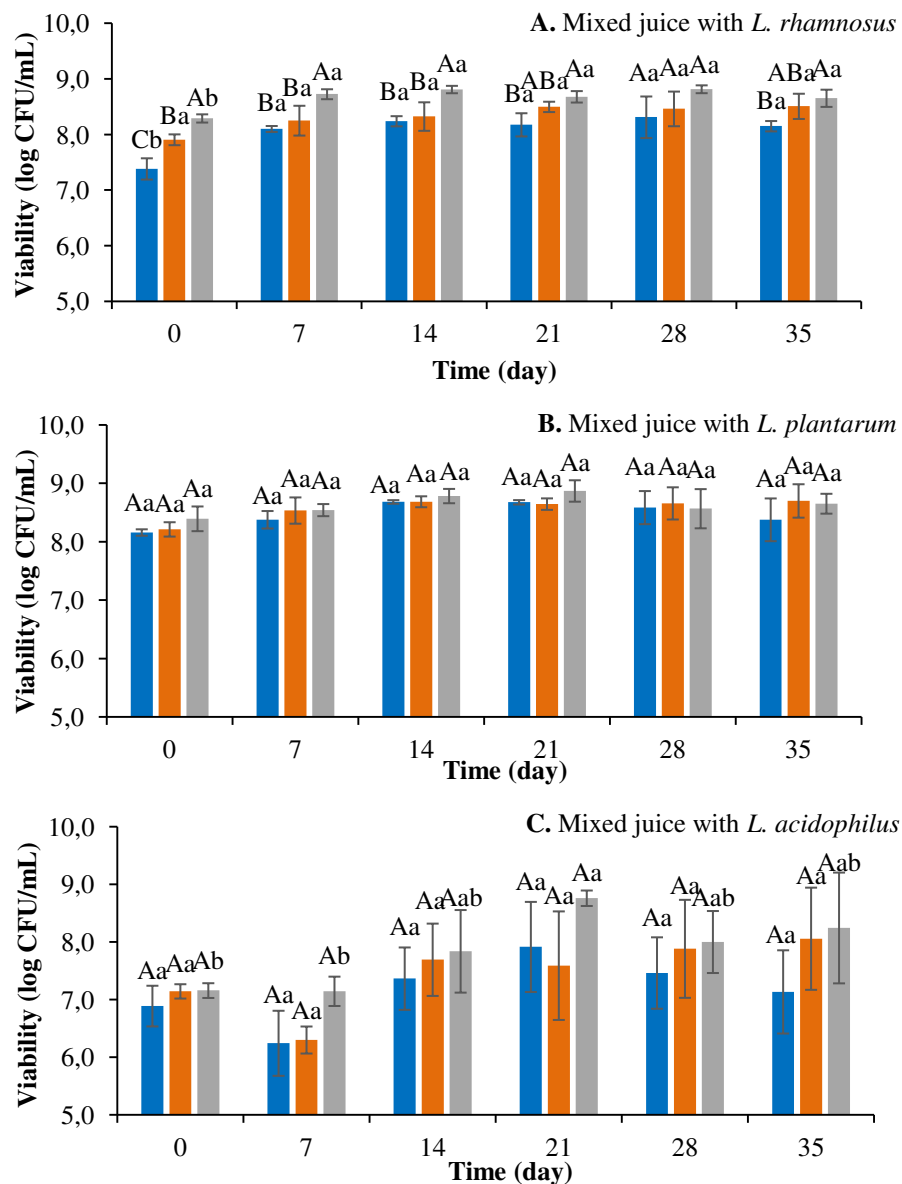


Figura 5. Evaluation of the probiotic microorganisms viability in the different formulations of mixed juices. F1_Mixed juice (■), F2_Mixed juice (■), F3_Mixed juice (■). Different upper case letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among the formulations at the same time and different lowercase letters indicate significant difference ($p < 0.05$) over time for each formulation.

According to Nualkaekul, Salmeron, & Charalampopoulos (2011), dietary fibers significantly influence the cellular survival of microorganisms after processing and during the shelf life of the product. Soluble fibers can be used as substrates for the growth of probiotic microorganisms and insoluble fibers may have a protective effect on these bacteria by promoting a physical barrier during passage through the gastrointestinal tract (Ray & Montet, 2014). In addition, the chemical composition of

juices, pH and organic acid concentration may also directly influence the viability of probiotic microorganisms. In this context, formulation 3 presented higher pH and lower acidity, contributing to a lower inhibition of the microorganisms present in these samples compared to the other formulations.

No reduction in the count of evaluated microorganisms was observed during the storage period independent of the formulation ($p > 0.05$) (Figure 5), which demonstrates the efficiency of the use of vegetable matrices, such as mango and carrot, as a source for the growth and maintenance of probiotic bacteria.

The highest average counts were obtained for *L. plantarum* (8.56 ± 0.19 log CFU/mL) and *L. rhamnosus* (8.35 ± 0.35 log CFU/mL) ($p > 0.05$) and *L. acidophilus* showed lower viability (7.49 ± 0.65 log CFU/mL) ($p < 0.05$). The same behavior was observed in the pre-inoculum of the mixed juice after 24 hours of incubation at 37 ° C. Therefore, from the results obtained, it was verified that *L. plantarum* showed better adaptation in the juice prepared with the matrices tested, which corroborates with Kleerebezem et al. (2003), who reported that *L. plantarum* has a high proportion of resistance genes, which play an important role in the interaction of the bacterium with the environment, resulting in a better viability compared to the other evaluated microorganisms. On the other hand, *L. acidophilus* showed a slower metabolism, which is confirmed by the lower counts, in absolute terms, in the more acidic formulations (formulations 1 and 2) (Figure 5).

3.5. Survival of *L. plantarum* to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

To exert beneficial effects on host health, probiotic microorganisms must resist the gastrointestinal conditions and to assess cell viability in the digestion phases, gastrointestinal conditions were simulated by *in vitro* assay. In order to carry out the study, *L. plantarum* was chosen because it presented the best viability, in absolute terms, in the mixed juice, regardless of the formulation, during refrigerated storage.

The viability of *L. plantarum* in the mixed juice decreased in the gastric phase (GP) after processing and after 35 days of storage at 8 °C ($p < 0.05$) (Figure 6). This is probably due to the low pH of this phase (pH value of 2.5), which may have caused the death of sensitive cells. In enteric phases I and II (EP I and II), the viability of *L. plantarum* remained similar to GP on day 0 of storage ($p > 0.05$) (Figure 6A), but after

35 days storage at 8 °C, there was a reduction in the count after EP II compared to GP (p <0.05) (Figure 6B).

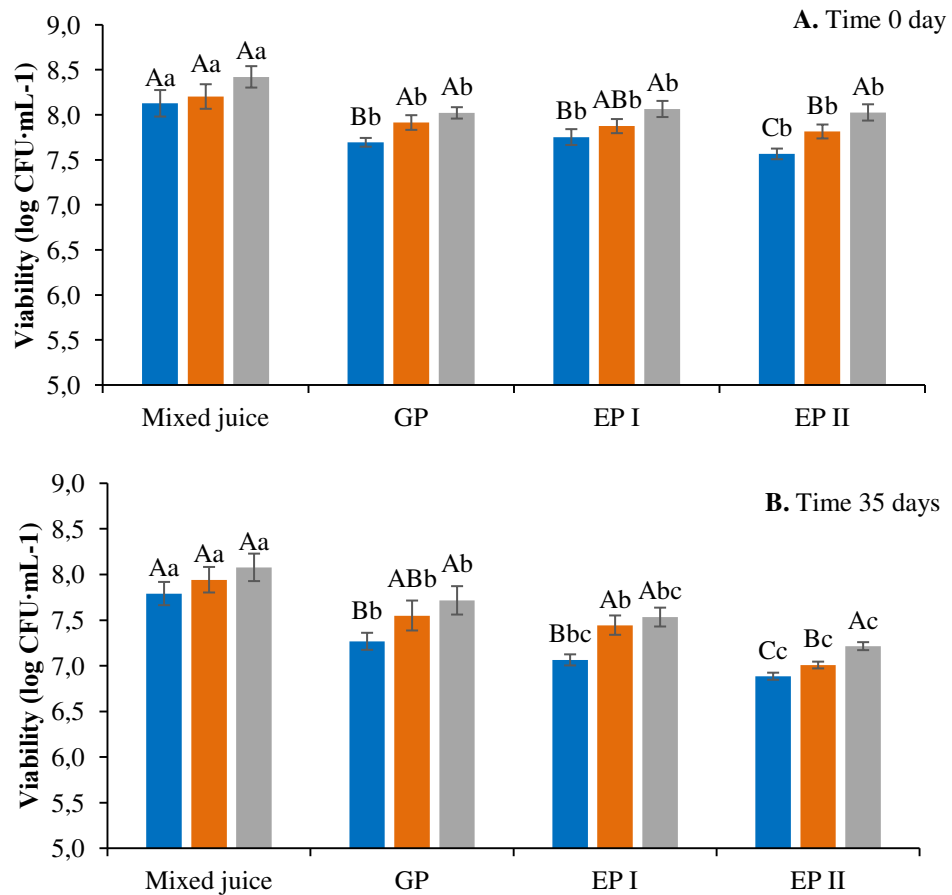


Figure 6. Survival of *L. plantarum* in different formulations of mango and carrot mixed juice submitted to in vitro simulated gastrointestinal conditions. Mixed juice: Mango and carrot mixed juice prior to initiation of in vitro simulation; GP: Gastric phase; EP I: Enteric phase I; EP II: Enteric phase II; F1 (■), F2 (■), F3 (■). Different upper case letters indicate significant difference (p <0.05) among the formulations in the same phase and different lowercase letters indicate significant difference (p <0.05) among the phases for the same formulation.

The enteric phases I and II, which simulate the small and large intestine, respectively, present higher pH, being 5.4-5.7 for EP I and 6.8-7.2 for EP II (Bedani, Rossi, & Saad, 2013). These higher pH values may have led to maintenance of probiotic viability, ensuring that the microorganism reaches the intestine with counts above 6 log CFU/mL, colonizing it and exerting positive effects on the host.

Formulation 3 showed the highest counts after passage through the simulated gastrointestinal conditions for both evaluated times ($p < 0.05$) (Figure 6), confirming the best results found for this formulation in the evaluation of viability in the mixed juice. Therefore, it was evident that a higher amount of carrot in the juice compared to the other formulations, promoted better conditions for the maintenance of viability of *L. plantarum*, contrary to formulation 1 that promoted less viability in general terms.

From these results, it can be verified that the different formulations affected the viability and survival to gastrointestinal tract of the probiotic microorganisms, in which the best intrinsic conditions (pH, fermentable sugars availability) and the higher fiber content (resulting in a more structured matrix) of the formulation 3 favored a better survival of microorganisms.

All formulations maintained counts above 7 log CFU/mL at the end of EP II after 35 days of storage at 8 °C (Figure 6), confirming that mixed juice of mango and carrot is a great vehicle for probiotic bacteria. This result suggests that different vegetable matrices can serve as substrate for the growth and maintenance of probiotic microorganisms, resulting in a high number of viable cells.

In order for the microorganisms to exert beneficial effects on the host, it is necessary to ingest at least 6 to 7 log CFU of viable cells daily (Martins, Ramos, Martins, & Leite Junior, 2016; Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, 2011). Other authors recommend a higher daily intake, about 8 to 10 log CFU per day (Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011). Based on this, in order to have a probiotic effect of the mango and carrot mixed juice added of *L. plantarum*, an approximate portion of 1 to 100 mL of the product should be ingested daily, since the mixed juices showed viable cell counts between 7-9 log CFU/mL.

4. Conclusions

Mixed juice of mango and carrot can be considered a great vehicle for probiotic bacteria, with emphasis on those that contained higher concentration of fibers in composition. In addition, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* and *L. acidophilus* showed good adaptability to this matrix, however, *L. plantarum* was highlighted with better viability and survived to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. At the end of this simulation, this microorganism presented counts above 7 log CFU/mL, which is enough for this bacteria to exert its probiotic effect. Our results show that mango and carrot mixed juice may be an alternative for the incorporation of these microorganisms in the

diet of individuals who do not consume dairy products, as well as other nutrients from mango and carrot such as vitamins, minerals, antioxidants and fibers, which give healthier characteristics to the product.

5. Acknowledgments

The authors thank *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* for the financial support.

6. References

Aboufazli, F., Shori, A. B., & Baba, A. S. (2016). Effects of the replacement of cow milk with vegetable milk on probiotics and nutritional profile of fermented ice cream. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 261-270.

Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122, 500-507.

Antunes, A. E. C., Liserre, A. M., Coelho, A. L. A., Menezes, C. R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K., & Azambuja, N. C. (2013). Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 125-131.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 16. ed. Washington, DC.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS – AOAC. (2012). *Official methods of analysis of AOAC International: Agricultural chemicals, contaminants, drugs*. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International.

Battistini, C., Gullón, B., Ichimura, E. S., Gomes, A. M. P., Ribeiro, E. P., Kunigk, L., Moreira, J. U. V., Jurkiewicz, C. (2018). Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 303-309.

Bedani, R., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, *34*, 382-389.

Betoret, E., Calabuig-Jiménez, L., Patrignani, F., Lanciotti, R., & Dalla Rosa, M. (2017). Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. *LWT - Food Science and Technology*, *85*, 418-422.

Bonneau, A., Boulanger, R., Lebrun, M., Maraval, I., & Gunata, Z. (2016). Aroma compounds in fresh and dried mango fruit (*Mangifera indica* L. cv. Kent): impact of drying on volatile composition. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*, 789-800.

Cadena, R. S., Cruz, A. G., Netto, R. R., Castro, W. F., Faria, J. A. F., & Bolini, H. M. A. (2013). Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. *Food Research International*, *54*, 1670-1679.

Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, *149*, 185-193.

Choi, M. H., Kim, G. H., & Lee, H. S. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood Orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, *35*, 753-759.

Costa, G. M., Silva, J. V. C., Mingotti, J. D., Barao, C. E., Klososki, S. J., & Pimentel, T. C. (2017). Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 195-201.

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15, 219-232.

Espirito-Santo, A. P., Carlin, F., & Renard, C. M. G. C. (2015). Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth?—A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. *Food Research International*, 78, 352-360.

Faraoni, A. S., Ramos, A. M., Guedes, D. B., & Pinto, M. R. M. R. (2013). Propriedades reológicas de sucos mistos de manga, goiaba e acerola adicionados de fitoquímicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16, 21-28.

Gilliland, S. E., & Speck, M. L. (1997). Use of the Minitex System for characterizing Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(6), 1289-1292.

Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria – an *in vitro* study. *Oral Microbiology Immunology*, 23, p. 482-485.

Kandyliis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58-63.

Kaur, G., & Aggarwal, P. (2016). Effect of thermal processing and chemical preservatives on the physicochemical and phytochemical parameters of carrot juice. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 35, 71-75.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., Vries, M., Ursing, B., Vos, W.M., & Siezen, R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 1990-1995.

Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D., & Hoschke, A. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. *Process Biochemistry*, *43*, 816-821.

Li, C.; Nie, S. P.; Zhu K. X.; Xiong, T.; Xie, M. Y. (2016). *Lactobacillus plantarum* NCU116 fermented carrot juice evokes changes of metabolites in serum from type 2 diabetic rats. *Food Research International*, *80*, 36-40.

Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, *44*, 465-470.

Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Martins, M. L., & Leite Junior, B. R. C. (2016). Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. *Food Science and Technology*, *36*, 540-548.

Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., Pinto, C. L. O., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, *51*, 764-770.

Matheyambath, A. C., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2016). Mangoes. *Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health*, p. 641-645. doi: 10.1016 / B978-0-12-384947-2.00442-6.

Moreira, R. M., Martins, M. L., Leite Júnior, B. R. C., Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Cristianini, M., Campos, A. N. R., Stringheta, P. C., Silva, V. R. O., Canuto, J. W., Oliveira, D. C., & Pereira, D. C. S. (2017). Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 259-268.

Nualkaekul, S., Salmeron, I., & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*, *129*, 1037-1044.

Oliveira, P. M., Ramos, A. M., Martins, E. M. F., Vieira, E. N. R., Soares, A. S., Noronha, M. C. (2017). Comparison of vacuum impregnation and soaking techniques for addition of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to minimally processed melon. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 2547-2554.

Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 415-422.

Prins, W. A., Botha, M., Botes, M., Kwaadsteniet, M., Endo, A., & Dicks, L. M. T. (2010). *Lactobacillus plantarum* 24, isolated from the marula fruit (*Sclerocarya birrea*), has probiotic properties and harbors genes encoding the production of three bacteriocins. *Current Microbiology*, 61, 584-589.

Ray, R. C., & Montet, D. (2014). Microorganisms and fermentation of traditional foods. In: Kohajdová, Z. *Fermented Cereal Products*. Boca Raton: CRC Press, 380p.

Richter, R. L., & Vedamuthu, E. R. (2001). Milk and milk products. In: Downes, F. P., & Ito, K. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4.ed. Washington: American Public Health Association - APHA, p. 483-495.

Rostami, F. M., Mousavi, H., Mousavi, M. R. N., & Shahsafi, M. (2018). Efficacy of probiotics in prevention and treatment of infectious diseases. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(12), 97-103.

Sabo, S. S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria*, Marcel Decker, New York (1993). 442 pp.

Savedboworn, W., Niyomrat, S., Naknovn, J., & Phattayakornb, K. (2017). Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract. *Agriculture and Natural Resources*, 51, 1-7.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007) .Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 279-284.

Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1-8.

Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T. K., Rademaker, J. L. W., Starrenburg, M. J., Kleerebezem, M., Molenaar, D., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strain isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology*, 12, 758-773.

CAPÍTULO 3

Suco misto de manga e cenoura processado termicamente e por alta pressão isostática adicionado de *Lactobacillus plantarum*

Resumo

Este trabalho objetivou elaborar suco misto de manga e cenoura processado por alta pressão isostática (API) e por pasteurização adicionado de *L. plantarum*. Suco misto, contendo a mesma proporção de polpa de manga e cenoura, foi processado por API e por pasteurização e adicionado de *L. plantarum*, sendo submetido à análises microbiológicas, físico-químicas, capacidade antioxidante, conteúdo de α -caroteno e β -caroteno, atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) e análise sensorial ao longo de 35 dias de estocagem a 8 °C. O processamento, por API ou por pasteurização, não influenciou na viabilidade de *L. plantarum*. A API manteve a qualidade microbiológica do produto, enquanto, os sucos pasteurizados, apresentaram contagens elevadas de micro-organismos psicotróficos aos 35 dias de estocagem a 8 °C. Os métodos de conservação aplicados não afetaram as características físico-químicas dos sucos. Entretanto, a presença de *L. plantarum* causou diminuição do pH e aumento da acidez dos sucos mistos ao longo do período de estocagem, mas não afetou a capacidade antioxidante, conteúdo de α -caroteno e β -caroteno e atividade enzimática. O processamento por API não influenciou na capacidade antioxidante do suco misto, por outro lado, os sucos pasteurizados tiveram um decréscimo na capacidade antioxidante e uma redução média de 30% no conteúdo total de α -caroteno e β -caroteno. A pasteurização reduziu a atividade das enzimas PPO e POD e a API promoveu redução na atividade de PPO e aumento, de cerca de 30%, na atividade de POD. Todos os sucos testados tiveram boa aceitação sensorial pelos consumidores, sendo o suco misto processado por API sem a adição de *L. plantarum* o que obteve a maior nota média (igual a 8,0). Portanto, o processamento por API mostrou-se melhor que a pasteurização, uma vez que manteve as características sensoriais dos sucos. Além disso, a matriz testada se mostrou eficiente para a manutenção da viabilidade de *L. plantarum*, podendo ser uma alternativa, como alimento probiótico, e, também, atender aos indivíduos que não consomem derivados lácteos.

Palavras-chave: probiótico; bebida; alta pressão isostática; tratamento térmico.

1. Introdução

As frutas e hortaliças são excelentes fontes de vitaminas, antioxidantes, compostos bioativos, fibra alimentar e minerais, além de possuírem sabores atraentes ao consumidor (VALERO-CASES; FRUTOS, 2017). A manga (*Mangifera indica*) é uma fruta tropical muito consumida e apreciada em todo o mundo devido ao seu gosto doce e suculência (MATHEYAMBATH; SUBRAMANIAN; PALIYATH, 2016). Por outro lado, a cenoura (*Daucus carota* L.) é uma das raízes vegetais mais comumente usada na alimentação, sendo utilizada *in natura* ou processadas (RIGANAKOS et al., 2017). Manga e cenoura contêm compostos funcionais, como carotenoides, vitaminas, compostos fenólicos, fibras e minerais (CADENA et al., 2013; RIGANAKOS et al., 2017) e são amplamente utilizadas para a fabricação de sucos.

A produção de suco misto tem sido bastante explorada por unir os benefícios de vários vegetais, originando um produto com melhor valor nutricional e boa aceitação. Para conservação desses produtos, na maioria das vezes, é utilizada a pasteurização, ou seja, processos térmicos que utilizam temperaturas até 100 °C para garantir a qualidade e a segurança alimentar dos sucos (ANDRÉS et al., 2016). Entretanto, apesar da inativação de micro-organismos e enzimas, temperaturas elevadas causam a perda de nutrientes importantes naturalmente presentes nos alimentos, como vitaminas, proteínas e carotenoides, além de alterar o sabor desses produtos (ABID et al., 2013). Com isso, tecnologias não térmicas vêm sendo estudadas para contornar esses problemas, garantindo a qualidade dos produtos e, dentre essas tecnologias, destaca-se o processamento por alta pressão isostática (API).

A API é um método de processamento não térmico que baseia-se no princípio isostático e no princípio de *Le Chatelier*; em que a pressão é igualmente aplicada em todas as direções dos alimentos e o mesmo responde de maneira que tende a minimizar a perturbação provocada (AUGUSTO; TRIBST; CRISTIANINI, 2018). O uso da API em alimentos torna-se vantajoso devido a sua eficácia na inativação microbiológica e enzimática, além de manter o valor nutricional e propriedades sensoriais, uma vez que esta tecnologia só afeta ligações não covalentes (ligações de hidrogênio, ligações iônicas e ligações hidrofóbicas). Devido à baixa compressibilidade das ligações covalentes, aminoácidos, vitaminas, moléculas de sabor e outros compostos de baixo peso molecular são raramente afetados (RODRÍGUEZ et al., 2012; BARBA et al., 2015).

Além de produtos mais próximos ao natural, os consumidores estão buscando alimentos que contenham em sua formulação nutrientes que lhes tragam benefícios além da nutrição básica, como, por exemplo, os probióticos. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde, probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Estudos têm demonstrado que os probióticos conferem benefícios como redução dos níveis de *Streptococcus mutans* (bactéria responsável pela cárie dentária) na saliva (ALP; BAKA, 2018); aumento da proteção contra o estresse oxidativo (HESHMATI et al., 2018); efeitos anticâncer ou antitumorais (FAGHFOORI et al., 2015); melhoramento das funções do fígado (NUÑO-LÁMBARRI; CHÁVEZ-TAPIA; URIBE, 2018); prevenção de alterações no sistema nervoso central (PRINCIPI; ESPOSITO, 2016); entre outros.

No mercado, a maior parte dos produtos probióticos encontrados são de base láctea, no entanto, o número de indivíduos que não consomem derivados do leite é crescente, devido a intolerância ou alergia aos lácteos, veganismo, dietas com restrição de colesterol, entre outros motivos. Com isso, novas matrizes vêm sendo exploradas, como alternativa para incorporação de bactérias probióticas na dieta. Os vegetais possuem naturalmente em sua composição prebióticos naturais, açúcares, antioxidantes e vitaminas que os tornam um bom veículo para o transporte dessas bactérias e não oferecem aos consumidores os inconvenientes relacionados aos produtos lácteos (MARTINS et al., 2016; SHORI, 2016).

Lactobacillus plantarum é um micro-organismo probiótico que possui ampla versatilidade, por apresentar um número relativamente elevado de funções reguladoras e de transporte, o que lhes admitem absorver rapidamente os solutos necessários ao seu metabolismo (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993; SABO et al., 2014).

Portanto, este estudo objetivou desenvolver suco misto de manga e cenoura processado termicamente e por API adicionado de *L. plantarum* e avaliar as características microbiológicas e físico-químicas, bem como capacidade antioxidante, conteúdo de alfa e beta caroteno e atividade de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), além da aceitabilidade sensorial dos produtos obtidos.

2. Material e métodos

2.1. Preparo das polpas e elaboração do suco misto

2.1.1. Processamento das polpas de manga e cenoura

As mangas da variedade Ubá (*Mangifera indica* L.) e as cenouras (*Daucus carota* L.) foram adquiridas no comércio da região de Ubá (Minas Gerais, Brasil). Ambos os vegetais foram sanitizados em solução de cloro orgânico a $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloro ativo, por um período de 15 minutos a $5 \text{ }^\circ\text{C}$, e enxaguados por imersão em solução clorada a $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloro ativo por 5 minutos. Após a etapa de higienização, as mangas foram despulpadas em despulpador mecânico (Tecmint, Pouso Alegre, Brasil) para obtenção da polpa e a cenoura foi triturada em liquidificador (Philips Walita Daily RI2004) com adição de água na proporção de 1:1.

2.1.2. Elaboração dos sucos mistos de manga e cenoura

Os sucos mistos foram preparados com 60% de polpa de vegetais, sendo 30% de manga e 30% de cenoura. Portanto, para a elaboração de 100 mL de suco misto, homogeneizou-se 30 mL de polpa de manga, 60 mL de polpa de cenoura (onde, 30 mL eram cenoura e 30 mL eram água, conforme descrito no item 2.1.1) e 10 mL de água potável.

2.2. Processamento do suco misto

2.2.1. Processamento por alta pressão isostática

O suco misto de manga e cenoura foi embalado a vácuo em saco de plástico flexível (LDPE-Nylon-LDPE, $16 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura - TecMaq, São Paulo, Brasil) e submetido a pressurização por meio de um equipamento de alta pressão isostática (QFP 2L-700, Avure Technologies Inc, EUA), cuja temperatura do bloco da câmara foi fixada em $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura inicial do suco foi ajustada para $8 \text{ }^\circ\text{C}$ considerando um aumento de $3 \text{ }^\circ\text{C}$ a cada 100 MPa devido a compressão adiabática durante a pressurização. A taxa de pressurização foi de $5,1 \text{ MPa/segundo}$ e o produto foi mantido a uma pressão de 500 MPa por um período de 5 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com despressurização praticamente instantânea ($<5 \text{ s}$).

2.2.2. Tratamento térmico de pasteurização

O suco misto foi submetido à pasteurização em tacho aberto a 90 °C/1 min sendo em seguida resfriado a 10 °C com água gelada (FARAONI et al., 2013).

2.2.3. Preparo e adição de *L. plantarum* aos sucos mistos

O preparo da cultura de *L. plantarum* e sua adição ao suco misto foi realizado conforme descrito por Moreira et al. (2017). Após o processamento por API e pasteurização, uma capsula de *L. plantarum* LP299V® (Jamieson™ Natural Sources), liofilizada e pronta para uso, contendo 10¹⁰ células foi adicionada à 100 mL de cada formulação de suco misto, sendo a mistura homogeneizada manualmente e incubada a 37 °C por 24 h. Esse produto foi chamado de pré-inóculo (PI). No dia seguinte, 10 mL de cada PI foram adicionados em 90 mL dos seus respectivos sucos. Além dos sucos adicionados de probiótico processados por ambas tecnologias, amostras de sucos processados por API e pasteurizadas sem a adição do micro-organismo também foram produzidas. Um tratamento controle, sem a aplicação de qualquer processo de conservação e sem adição de *L. plantarum* também foi elaborado.

Portanto, foram obtidos 5 tratamentos: 1- suco misto controle (suco misto não processado sem adição de *L. plantarum* - SC); 2- suco misto processado por API com adição de *L. plantarum* (API-P); 3- suco misto processado por API sem adição de *L. plantarum* (API-SP); 4- suco misto pasteurizado com adição de *L. plantarum* (Past-P); e 5- suco misto pasteurizado sem adição de *L. plantarum* (Past-SP).

Após a obtenção de todos os sucos mistos, estes foram envasados em garrafas de vidro estéreis de 100 mL com tampas metálicas e armazenados a 8 °C por um período de até 35 dias. O experimento foi realizado em 3 repetições.

2.3. Determinação das características microbiológicas

2.3.1. Viabilidade de *L. plantarum* em suco misto de manga e cenoura

A viabilidade de *L. plantarum* foi determinada em 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de processamento dos sucos mistos armazenados a 8 °C. O plaqueamento foi feito pela técnica "pour plate" em meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe (MRS) adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001). As placas foram incubadas a 37 °C por até 72 horas em jarras de anaerobiose. As amostras

não adicionadas de probiótico também foram submetidas as mesmas condições de ensaio.

2.3.2. Determinação da qualidade microbiológica

As análises microbiológicas de coliformes a 30 °C e a 45 °C foram realizadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com Kornacki; 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 mililitro de suco ou polpa.

A contagem de micro-organismos psicrotróficos foi determinada segundo Cousin; Jay; Vasavada (2001) utilizando-se Ágar Padrão para Contagem (PCA) com incubação a 7 °C por 10 dias. Para a contagem das colônias de psicrotróficos, foram selecionadas as placas contendo de 25 a 250 colônias e os resultados foram expressos em número de UFC (unidades formadoras de colônias) por mililitros do produto.

As amostras dos sucos misto de manga e cenoura não tratados, tratados por pasteurização ou por API, adicionados ou não de *L. plantarum* foram analisadas nos dias 0 e 35 de armazenamento a 8 °C, a fim de avaliar as condições microbiológicas do produto no início e no fim da sua vida de prateleira. As polpas de manga e cenoura foram avaliadas logo após sua obtenção.

2.4. Avaliação das características químicas e físicas das polpas e dos sucos

Os sucos mistos de manga e cenoura dos diferentes tratamentos: SC, API-P, API-SP, Past-P e Past-SP foram analisados nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento do produto a 8 °C.

As polpas de manga e cenoura também foram caracterizadas no tempo 0 de armazenamento.

2.4.1. Análises de pH, acidez e sólidos solúveis totais

As análises de pH, acidez total titulável e sólidos solúveis totais foram realizadas conforme metodologia da AOAC (2000). Foram pesados 10 g de amostra e adicionados em 100 mL de água destilada. O pH foi determinado por leitura direta em potenciômetro (MS Tecnocon mPA-210). Para determinar a acidez, em percentual de

ácido cítrico, o suco foi titulado com uma solução padrão $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaOH até que se alcançou um pH final de 8,2-8,4 (ponto final da titulação).

A determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST) foi realizada diretamente em refratômetro de bancada modelo ABBÉ (WYA-2S), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo os resultados expressos em $^\circ\text{Brix}$.

2.5. Determinação da capacidade antioxidante

2.5.1. Preparação do extrato

Foram misturados 20 mL de suco misto com 80 mL de metanol e, em seguida, o homogenato foi sonificado durante 15 min e centrifugado a 12.000 g a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Este procedimento foi repetido duas vezes para assegurar a máxima extração (LIU et al., 2014).

2.5.2. Atividade sequestrante do radical livre DPPH

A atividade sequestrante do radical DPPH $^\bullet$ foi determinada segundo metodologia adaptada de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). Inicialmente, preparou-se a solução de DPPH $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ (solução padrão) e, em seguida, procedeu-se a diluição dos extratos em metanol para que ficassem dentro da faixa da curva padrão. A diluição estabelecida foi 1:10. Para a reação, 0,1 mL de cada extrato diluído foi homogeneizado com 2,9 mL da solução de DPPH e deixados reagir por 90 minutos (tempo determinado por meio de ensaios preliminares) à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Logo após, as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo UV 1800, Shimadzu, São Paulo, Brasil) a 515 nm, utilizando metanol como branco. Os resultados foram expressos em mM de Trolox equivalente/mL do produto.

2.5.3. Atividade antioxidante pelo método do ABTS $^{+\bullet}$

A determinação da capacidade antioxidante por meio do método ABTS $^{+\bullet}$ foi conduzida segundo Re et al. (1999), com modificações. Inicialmente, o radical ABTS $^{+\bullet}$ foi formado através da reação de 5 mL de persulfato de potássio 2,45 mM com 5 mL de solução de ABTS 7 mM e armazenado no escuro por 16 horas a temperatura ambiente. O radical formado foi diluído em etanol até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,020$ no comprimento de onda 734 nm. O extrato foi devidamente diluído (1:50) e, uma alíquota de 500 μL do diluído, foi transferida para tubos de ensaio juntamente com 3,5 mL do

radical ABTS^{•+}. As absorvâncias foram lidas a 734 nm, após 90 minutos da reação, utilizando etanol como branco. Trolox nas concentrações de 100 a 2000 µM foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em mM de Trolox equivalente por mililitro de produto.

2.6. Extração e determinação de α -caroteno e β -caroteno

Os carotenoides foram extraídos segundo metodologia descrita por Rodriguez-Amaya et al. (1976), com modificações. Cerca de 1 g de amostra foi pesada e adicionada de 60 mL de acetona resfriada (dividida em três volumes de 20 mL), homogeneizada em microtritador por, aproximadamente, 5 minutos após cada adição, e filtrada a vácuo em funil de Büchner utilizando-se papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido, em três frações, para um funil de separação contendo 50 mL de éter de petróleo resfriado, sendo cada fração lavada com água destilada para retirada total da acetona. Foi acrescentado sulfato de sódio anidro ao extrato em éter de petróleo para retirar qualquer resíduo de água que, porventura, tenha restado e que pudesse prejudicar a evaporação do material. Posteriormente, o extrato dissolvido no éter foi concentrado utilizando evaporador rotativo (IKA®, Modelo RV 10 BASIC) a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Esse extrato foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com éter de petróleo.

Para análise, alíquotas de 10 mL do extrato foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio gás, sendo o resíduo seco redissolvido em 2 mL de acetona. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm, sendo injetados 50 µL no cromatógrafo.

A determinação do teor de α -caroteno e β -caroteno foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu Co., Ltd., Japão), sendo utilizadas as condições cromatográficas descritas por Pinheiro-Sant'Ana et al. (1998), as quais incluem: sistema CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD) e coluna cromatográfica RP-18 Phenomenex Gemini (250 x 4,6 mm, 5 µm), munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18) (4 mm x 3 mm). A fase móvel foi composta de metanol: acetato de etila: acetonitrila (80:10:10, v/v/v) com fluxo de $1,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e tempo de corrida de 15 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 450 nm. A identificação de α -caroteno e β -caroteno nas amostras foi realizada comparando-se os tempos de retenção obtidos para os respectivos padrões e para as amostras analisadas sob as mesmas condições. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do

padrão e do pico de interesse nas amostras, utilizando-se o detector de arranjo de diodos. As determinações foram realizadas em duplicata.

As curvas de calibração dos padrões foram feitas diluindo os padrões de Stock em álcool isopropílico para se obter 0,05-5 mg·L⁻¹ (α -caroteno) e 1-20 mg·L⁻¹ (β -caroteno). As diluições foram filtradas, antes da injeção no sistema CLAE, em unidades filtrantes de polietileno com porosidade de 0,45 μ m.

O conteúdo de α -caroteno e β -caroteno relativo foi calculado considerando como 100% o teor desses carotenoides das amostras do suco misto antes dos processos de pasteurização e API sem a presença do probiótico, ou seja, do suco controle.

2.7. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO) e de peroxidase (POD)

Para extração das enzimas adotou-se metodologia de Cano; Hernandez; De Ancos (1997) em que foram misturados 10 g de amostra e 0,5 % de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida, foram adicionados 50 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) e homogeneizados em misturador de elevada tensão de corte (Ultra-TURRAX®, modelo T-25D, IKA®, Alemanha) a 16.000 rpm durante 2 min. A amostra homogeneizada foi centrifugada a 15.300 g por 15 minutos a 4 °C (Beckman Coulter®, Brea, CA, EUA) e o sobrenadante, contendo as enzimas PPO e POD (extrato bruto) foi utilizado para determinar a atividade das enzimas.

A atividade de PPO foi medida de acordo com o método descrito por Tribst et al. (2016) com modificações. A solução de enzima foi preparada utilizando 0,5 mL do extrato bruto diluído em 2 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5). Posteriormente, uma alíquota de 300 μ L foi misturada com 3 mL de catecol 0,2 M em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) para iniciar a reação. A velocidade inicial de formação de quinona foi monitorizada pelo aumento na absorbância a 420 nm a 25 °C usando um espectrofotômetro DU 800 de UV-Visível (Beckman Coulter®, Brea, CA, EUA), durante 1 minuto.

A atividade de POD também foi medida de acordo com o método descrito por Tribst et al. (2016) com modificações. Para isso, 200 μ L do extrato diluído conforme descrito anteriormente, foram adicionados em 3 mL de guaiacol e 0,2 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 0,05%. A absorbância foi medida a 485 nm a 25 °C (800 DU espectrofotômetro de UV-Visível - Beckman Coulter® Brea, CA, EUA), durante 1 minuto.

A atividade enzimática foi calculada com base no declive da porção linear da curva de Aa₄₂₀ para PPO e Aa₄₈₅ para POD registrada em função do tempo (até 1 min). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa como a quantidade de enzima que provocou um aumento na absorvância de 0,001 por minuto sob condições de ensaio, de acordo com a equação 1:

$$U = \frac{IR \times f}{0,001} \quad 1$$

Em que:

IR: inclinação da reta

f: fator diluição

A atividade enzimática relativa (AER) foi calculada considerando como 100% a atividade das amostras do suco misto antes dos processos de pasteurização e API sem a presença do probiótico, ou seja, do suco controle, de acordo com a equação 2:

$$AER = \frac{AE_1}{AE_2} \times 100 \quad 2$$

Em que:

AE₁: atividade enzimática após o processo

AE₂: atividade enzimática antes do processo

2.8. Análise sensorial

A aceitabilidade sensorial das amostras de suco misto de manga e cenoura submetidas aos processos de API e pasteurização e adicionadas ou não de *L. plantarum* foi realizada logo após o processamento, por 53 provadores não treinados, em cabines individuais e sob luz branca, usando escala hedônica estruturada de nove pontos, variando de “desgostei extremamente” (1) a “gostei extremamente” (9) para os atributos cor, aroma, sabor e impressão global (Minim, 2013).

A avaliação sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 2.020.120).

2.9. Análise Estatística

Os sucos processados por API e pasteurizados com e sem adição de *L. plantarum* foram elaborados em três repetições e submetidos à análises, em triplicata, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento.

Foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado em parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os tratamentos e nas subparcelas o tempo de armazenamento. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças entre os tratamentos ao nível de 5 % de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico STATISTICA 7,0 (StatiSoft, Inc., Tulsa, Okla., EUA).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização físico-química e qualidade microbiológica das polpas de manga e cenoura

As polpas de manga e cenoura sem nenhum tipo de tratamento foram caracterizadas e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

A cenoura possui maior pH e menor acidez em comparação à manga. Essa característica impactou diretamente na formulação do suco o qual apresenrou pH acima de 4,5, favorecendo, desta forma, a manutenção da viabilidade de *L. plantarum* adicionado ao produto. Por outro lado, favorece também o desenvolvimento de outros micro-organismos deterioradores e patogênicos, daí a importância de adotar um tratamento de conservação que assegure a inocuidade do produto para os consumidores.

Tabela 1. Características físico-químicas e microbiológicas das polpas de manga e cenoura

Características físico-químicas				
	pH	Acidez	SST (°Brix)	
Manga	4,16	0,56	21,2	
Cenoura	7,32	0,08	2,3	
Avaliação microbiológica				
	NMP/mL de coliformes		Psicrotróficos (log UFC·mL ⁻¹)	Bactérias lácticas (log UFC·mL ⁻¹)
	Coliformes a 30 °C	Coliformes a 45 °C		
Manga	3,6	14	3,7	<1,0
Cenoura	<3,0	6,8	4,1	<1,0

As polpas apresentaram baixas contagens de micro-organismos contaminantes (Tabela 1), evidenciando que as boas práticas de fabricação foram seguidas no processo de obtenção dessas polpas, uma vez que as mesmas não passaram por nenhum processo de conservação. Além disso, verificou-se que as polpas apresentaram contagens $<1,0$ log UFC·mL⁻¹ de bactérias lácticas, portanto, os resultados encontrados para esse grupo de bactérias no suco (Figura 1) se deve exclusivamente a *L. plantarum* adicionado.

Em relação aos carotenoides, a polpa de manga apresentou 2,15 mg de β -caroteno·100 g⁻¹ e não foi detectado α -caroteno. A polpa de cenoura apresentou 45,58 mg·100 g⁻¹ e 1,04 mg·100 g⁻¹ de α e β -caroteno, respectivamente. O principal benefício associado aos carotenoides é o seu potencial antioxidante (FIEDOR; BURDA, 2014) e função pró-vitamina A (GURMU; HUSSEIN; LAING, 2014). Além disso, há evidências de que esses compostos têm efeitos benéficos sobre a saúde ocular e cardiovascular, função cognitiva e podem ajudar a reduzir o risco de alguns tipos de câncer (EGGERSDORFER; WYSS, 2018).

A polpa de manga apresentou maior capacidade antioxidante (63,03 mM, pelo método ABTS) em comparação com a cenoura (4,28 mM, pelo método ABTS).

3.2. Determinação das características microbiológicas dos sucos

3.2.1. Viabilidade de *L. plantarum* em suco misto de manga e cenoura

A viabilidade de *L. plantarum* no pré-inóculo foi de 8,9 log UFC·mL⁻¹ de suco após 24 horas de fermentação a 37 °C e a contagem do probiótico ao longo do período de estocagem a 8 °C está apresentada na Figura 1. Observou-se que os métodos de conservação aplicados ao suco misto (API e pasteurização) não influenciaram na sobrevivência do micro-organismo ($p>0,05$) que apresentou contagens médias de 8,2 log UFC·mL⁻¹ no tempo zero e 9,0 log UFC·mL⁻¹ após 35 dias de armazenamento a 8 °C ($p<0,05$).

Para que os micro-organismos probióticos exerçam efeitos benéficos ao hospedeiro, eles precisam resistir ao trato gastrointestinal e chegarem ao intestino em número suficiente (RANADHEERA et al., 2017). Alguns autores recomendam doses diárias de 10^6 - 10^7 UFC por grama ou mililitro de células viáveis do produto (MADUREIRA et al., 2011; MARTINS et al., 2016), enquanto outros recomendam uma quantidade maior, cerca de 10^9 - 10^{10} UFC de células viáveis por grama ou mililitro (NAIDU; ADAM; GOVENDER, 2012). Desta forma, os sucos mistos de manga e

cenoura processados por API e pasteurizados podem ser considerados veículos promissores para o carregamento de *L. plantarum*, uma vez que apresentaram contagens superiores a 10^8 UFC·mL⁻¹ de células viáveis no início e final da vida de prateleira do produto. Com isso, o consumo diário de 100 mL do suco misto é suficiente para que 10^{10} células probióticas viáveis sejam ingeridas, podendo, portanto, alcançar os benefícios a saúde conferidos por esse micro-organismo.

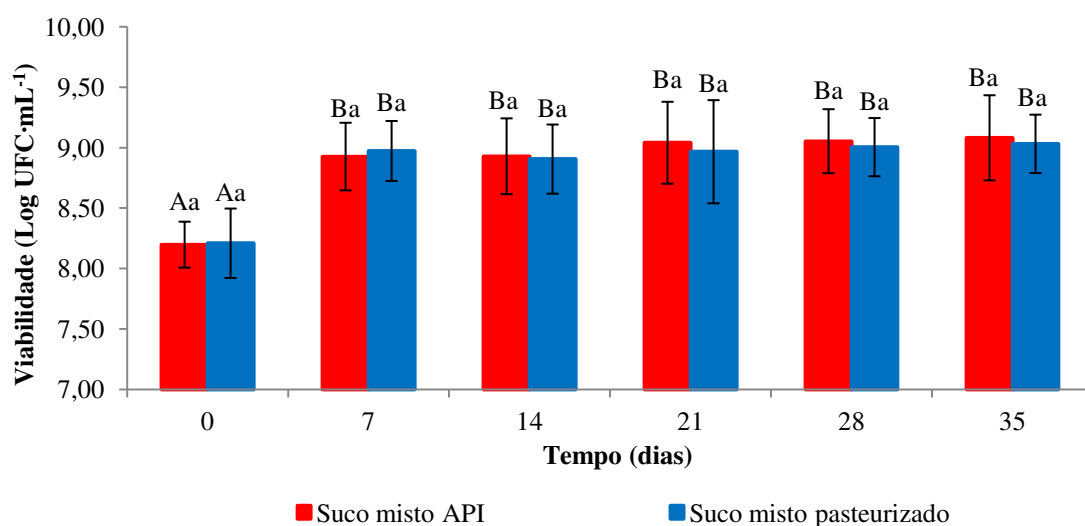


Figura 1. Avaliação da viabilidade de *L. plantarum* em suco misto processado por alta pressão (suco misto API) e por pasteurização (suco misto pasteurizado). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Muitos estudos vêm sendo realizados mostrando que as matrizes vegetais possuem características desejáveis para o desenvolvimento e manutenção da viabilidade de micro-organismos probióticos, como exemplo, salada de frutas minimamente processada (MARTINS et al., 2016), melão minimamente processado (OLIVEIRA et al., 2017), suco misto de juçara e manga (MOREIRA et al., 2017), bebida à base de soja (BATTISTINE et al., 2018) e de extrato de arroz (SAVEDBOWORN et al., 2017), entre outros, os quais corroboram com os resultados encontrados nesse estudo. De acordo com Martins et al. (2016), os vegetais apresentam potencial para atuarem como veículo de probióticos com uma elevada viabilidade celular em função das características intrínsecas dos vegetais, como a presença de fibras, vitaminas,

carboidratos, sais minerais e agentes antioxidantes, que podem ser usados como substratos por essas bactérias.

3.1.2. Qualidade microbiológica

A resolução nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde estabelece como padrão, o máximo de 10 NMP/mL de coliformes a 45 °C por mililitro do produto (BRASIL, 2001). Com base na legislação, os sucos mistos obtidos por API e pasteurizados mantiveram suas características microbiológicas preservadas ao longo do período de estocagem (Tabela 2), evidenciando que as condições de processo aplicadas foram suficientes para garantir a inocuidade do produto em relação aos micro-organismos do grupo coliformes. Por outro lado, houve um aumento na contagem de micro-organismos psicotróficos nos sucos pasteurizados após 35 dias de estocagem a 8 °C, enquanto que, para os sucos processados por API, esse aumento não foi verificado (Tabela 2). Esse resultado sugere que a API possui maior eficiência na manutenção da qualidade microbiológica do produto por um maior período de tempo. O suco controle apresentou contagens de coliformes a 30 e a 45 °C e micro-organismos psicotróficos superiores aos sucos submetidos aos processos de conservação e, no dia 35 de armazenamento, esse suco já não atendia a legislação.

Tabela 2. Número Mais Provável de coliformes a 30 e a 45 °C e contagem de micro-organismos psicotróficos em suco misto de manga e cenoura tratado por API e pasteurizado com e sem adição de *L. plantarum*

Coliformes a 30 °C (NNM·mL ⁻¹)					
Tempo (dias)	Controle	API		Pasteurizado	
		Com probiótico	Sem probiótico	Com probiótico	Sem probiótico
0	12,3	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
35	112,5	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
Coliformes a 45 °C (NNM·mL ⁻¹)					
Tempo (dias)	Controle	API		Pasteurizado	
		Com probiótico	Sem probiótico	Com probiótico	Sem probiótico
0	3,3	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
35	19	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
Psicotróficos (Log UFC·mL ⁻¹)					
Tempo (dias)	Controle	API		Pasteurizado	
		Com probiótico	Sem probiótico	Com probiótico	Sem probiótico
0	4,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
35	7,54	< 1,0	< 1,0	5,02	5,57

Zhao et al. (2014) observaram redução nas contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios em suco de maçã tratado termicamente (110 °C/8,6 s) e por API (550 MPa/6 min/25 °C) quando comparados ao controle (sem tratamento). No entanto, a contagem aumentou aproximadamente 1 ciclo log após 60 dias de armazenamento a 4 °C. Os autores acreditam que o aumento da contagem desses micro-organismos em suco de maçã fresco pode ter sido causado pela multiplicação de células sobreviventes e pela recuperação de células lesadas durante o processamento.

Zhang et al. (2016) verificaram resultados semelhantes para suco de cenoura pasteurizados a 110 °C/8,6 s e submetidos a pressurização a 550 MPa/6 min/25 °C. Após 20 dias de armazenamento dos sucos a 4 °C, os autores verificaram aumento na contagem total de micro-organismos nos sucos submetidos ao tratamento de pasteurização. Li et al. (2010) descobriram que bactérias danificadas na pasteurização ou pressurização podem recuperar sua viabilidade durante o armazenamento dependendo do dano que sofreram e da matriz alimentar que se encontram.

3.3. Avaliação das características químicas e físicas dos sucos

3.3.1. pH, acidez e sólidos solúveis totais

No tempo 0 de armazenamento do produto, não foi observada diferença entre os tratamentos, inclusive o controle, para os parâmetros de pH e acidez ($p > 0,05$) (Figura 2A e 2B). Ao longo do período de armazenamento a 8 °C, houve uma diminuição do pH e aumento da acidez para os sucos adicionados de probiótico ($p < 0,05$) (Figura 2A e 2B), essas alterações também foram observadas no suco controle ($p < 0,05$), reflexo da presença de micro-organismos contaminantes.

As alterações nesses parâmetros físico-químicos (pH e acidez) nos sucos adicionados de *L. plantarum* se deve a presença do probiótico, sugerindo que esse micro-organismo mantém seu metabolismo mesmo sob condições de refrigeração, evidenciando a capacidade que as matrizes vegetais possuem em manter a viabilidade de micro-organismos probióticos. Além disso, esses resultados mostram a eficiência dos métodos de conservação aplicados, uma vez que a API e a pasteurização proporcionaram a manutenção das características de pH e acidez do produto por 35 dias de armazenamento a 8 °C (Figura 2).

De acordo com Rodrigues et al. (2012), culturas probióticas podem metabolizar os açúcares simples presentes no suco, resultando na produção de pequenas quantidades de ácidos orgânicos. Além disso, segundo Chim; Zambiasi; Rodrigues (2013), reações envolvidas na decomposição do produto, como hidrólise, oxidação e fermentação, geram compostos ácidos que, por consequência, aumentam a acidez e diminuem o pH do meio.

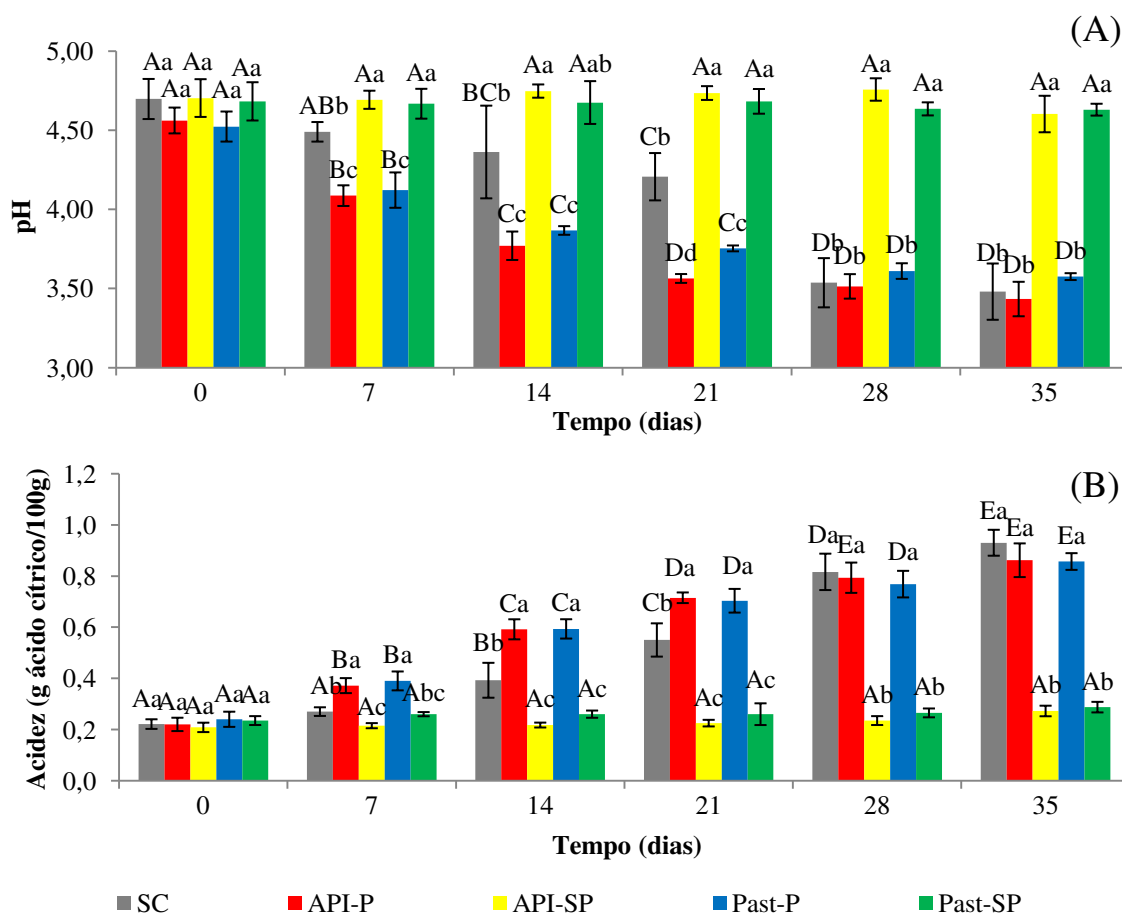


Figura 2. Avaliação do pH (A) e acidez (B) do suco misto. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Moreira et al. (2017) elaboraram suco misto de juçara e manga Ubá processados termicamente e por API adicionados de *L. rhamnosus* GG e verificaram que os sucos que continham o probiótico em sua formulação tiveram decréscimo de pH e aumento da acidez após 30 dias de estocagem a 4 °C. De acordo com os autores, estas diferenças podem estar relacionadas à ação fermentativa do micro-organismo probiótico no pré-

inoculo, uma vez que 10 mL deste, que foi inoculado com 10^{10} células de *L. rhamnosus* GG e incubado a 37 °C por 24 h, foram adicionados em 90 mL de suco recém-processado.

Resultados semelhantes para esses parâmetros também foram encontrados por Nematollahi et al. (2016), ao estudar suco de cereja cornalina, com pH ajustado para 3,5, contendo *L. casei* T4 no período de 28 dias de armazenamento a 4 °C e por Pimentel et al. (2015), que estudaram suco de maçã clarificado adicionado de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* por 28 dias de estocagem a 4 °C.

O teor de sólidos solúveis totais dos sucos mistos não foi afetado pelos métodos de conservação e pela adição de *L. plantarum*, apresentando média, tanto no início como no final da vida de prateleira, de 7,6 °Brix ($p>0,05$) (Figura 3).

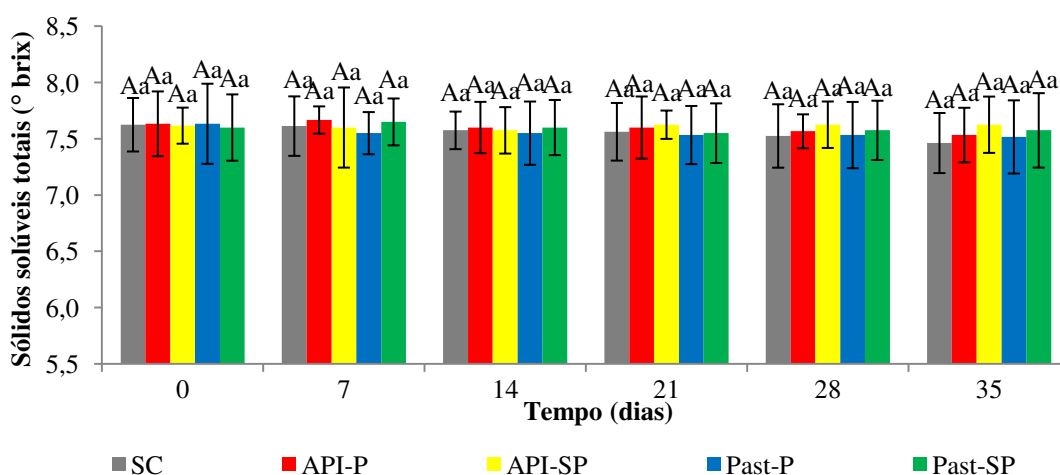


Figura 3. Conteúdo de sólidos solúveis totais de suco misto de manga e cenoura. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Segundo Chim; Zambiasi; Rodrigues (2013), os sólidos solúveis são constituídos na sua maioria por açúcares, os quais são utilizados pelos microorganismos como fonte de energia para o crescimento. No entanto, esse consumo não promoveu uma redução significativa do teor de SST, que se manteve constante nas amostras de sucos mistos durante a estocagem. Outra possibilidade, para a manutenção do teor de SST se deve pela atuação de *L. plantarum* sobre os açúcares insolúveis presentes, promovendo um balanceamento ao longo da estocagem.

3.4. Capacidade antioxidante dos sucos

Nesse estudo, foram utilizados dois métodos para avaliar a capacidade antioxidante dos sucos mistos, por meio da capacidade de eliminação do radical DPPH e da atividade sequestrante do radical ABTS. De acordo com Liu et al. (2016), as propriedades antioxidantes dos vegetais são influenciadas por vários fatores, como a composição dos componentes bioativos presentes no produto e a condição dos sistemas de teste, por isso, não podem ser totalmente avaliados com um único método de determinação de capacidade antioxidante.

Como observado nos resultados apresentados nas Figuras 4A e 4B, a presença do micro-organismo probiótico não afetou a capacidade antioxidante do suco misto. O processamento por API não influenciou a capacidade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e ABTS do suco misto ($p>0,05$), em relação ao suco controle, por outro lado, os sucos que passaram pelo processo de pasteurização tiveram um decréscimo na capacidade antioxidante avaliada por ambos os métodos, quando comparados aos sucos controle ($p<0,05$) (Figura 4A e 4B). Portanto, os sucos processados por API apresentaram maior capacidade de eliminar radicais livres comparados aos sucos pasteurizados. Além disso, o tempo de armazenamento a 8 °C não influenciou na capacidade antioxidante dos sucos mistos ($p>0,05$) (Figura 4A e 4B).

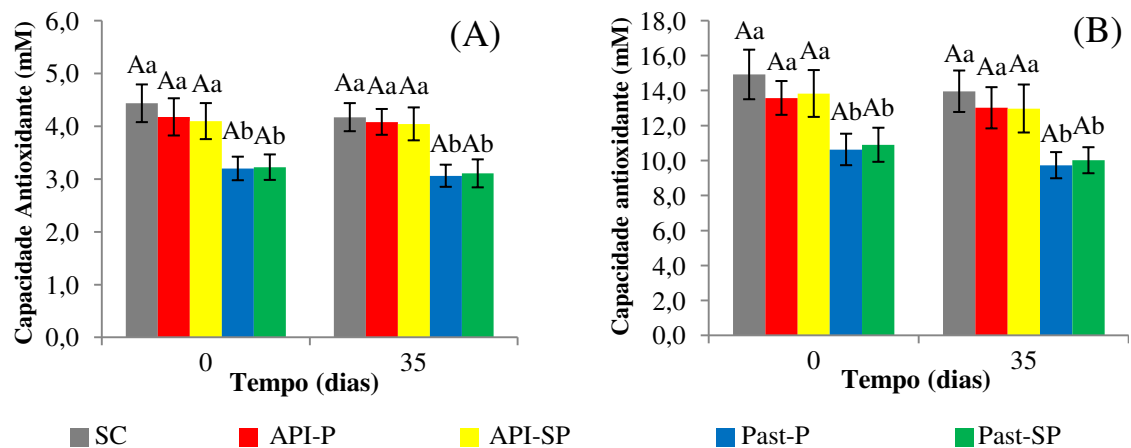


Figura 4. Avaliação da capacidade antioxidante de suco misto de manga e cenoura processado por API e pasteurizado com ou sem adição de *L. plantarum*. (A) Capacidade antioxidante por DPPH e (B) Capacidade antioxidante por ABTS. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Independente do método de determinação, os resultados para capacidade antioxidante dos vegetais variaram com base nas características da matriz alimentar, nos tipos de tratamentos de conservação aplicados, nas condições de processamento, entre outros. Desta forma, é importante verificar o efeito de cada tecnologia sobre cada matriz alimentar para que se escolha o melhor método de conservação baseado nas características do produto.

As ligações covalentes, as quais estão presentes em compostos voláteis, vitaminas e compostos antioxidantes como antocianinas e carotenoides, possuem um comprimento da ligação resistente a compressão, ou seja, são moléculas pequenas, portanto, esses compostos são minimamente afetados pela pressurização que ocorre no processo de alta pressão (BALASUBRAMANIAN; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO; GUPTA, 2015). Por outro lado, o uso de temperaturas elevadas pode levar a perdas de compostos nutricionais e propriedades antioxidantes (OMS-OLIU et al., 2012), o que justifica a redução da capacidade antioxidante dos sucos mistos pasteurizados. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados para o teor de alfa e beta caroteno, onde os sucos pasteurizados tiveram maior perda desses compostos (Figura 5).

3.5. Determinação de α -caroteno e β -caroteno

Os carotenoides são pigmentos insolúveis em água e amplamente reconhecidos por sua capacidade bioativa, como por exemplo, a função pro vitamina A do β -caroteno. São responsáveis pelas cores amarelo-vermelho nas flores, frutas, vegetais, microorganismos e também alguns animais e produtos de origem animal, como salmão e gema de ovo (RODRIGUES; MERCADANTE; MARIUTTI, 2018).

O processamento de alimentos geralmente leva à degradação de carotenoides por oxidação e isomerização. O aumento da temperatura e do tempo de processamento, bem como a grande quantidade de concentração de oxigênio, levam à extensa degradação dos carotenoides (NGAMWONGLUMLERT; DEVAHASTIN, 2018). Fratianni; Cinquanta; Panfili (2010), por exemplo, avaliaram o efeito da temperatura na degradação de carotenoides no suco de laranja e observaram que o uso de temperatura mais elevada (85 °C/1 min) resultou na perda de 57 % de α -caroteno e de 66 % de β -caroteno.

No presente estudo, o teor de α -caroteno e β -caroteno encontrado no suco controle no dia 0 de armazenamento foi, respectivamente, $20,05 \pm 1,92 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ e

2,03 ± 0,15 mg·100 mg⁻¹. Verificou-se que a presença de *L. plantarum* não afetou o teor de α -caroteno e β -caroteno dos sucos mistos processados por API e pasteurizados tanto após a fabricação como após 35 dias de armazenamento a 8 °C (p>0,05) (Figura 5A e 5B). Por outro lado, constatou-se diferença do teor de carotenoides entre os métodos de conservação (p<0,05), sendo que a pasteurização provocou uma redução média de 30% no conteúdo total de α -caroteno e β -caroteno. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Sánchez; Barana; Marañón (2014), que não observaram perdas de carotenoides em cenoura, tomate e pimentão vermelho submetidos a pressão de 625 MPa por 5 minutos a 20 °C. Chen et al. (2015) também observaram que o processamento por API (550 MPa/5 min/20 °C) conservou melhor os carotenoides e a capacidade antioxidante de bebida de mamão quando comparado a pasteurização (110 °C/8,6 s).

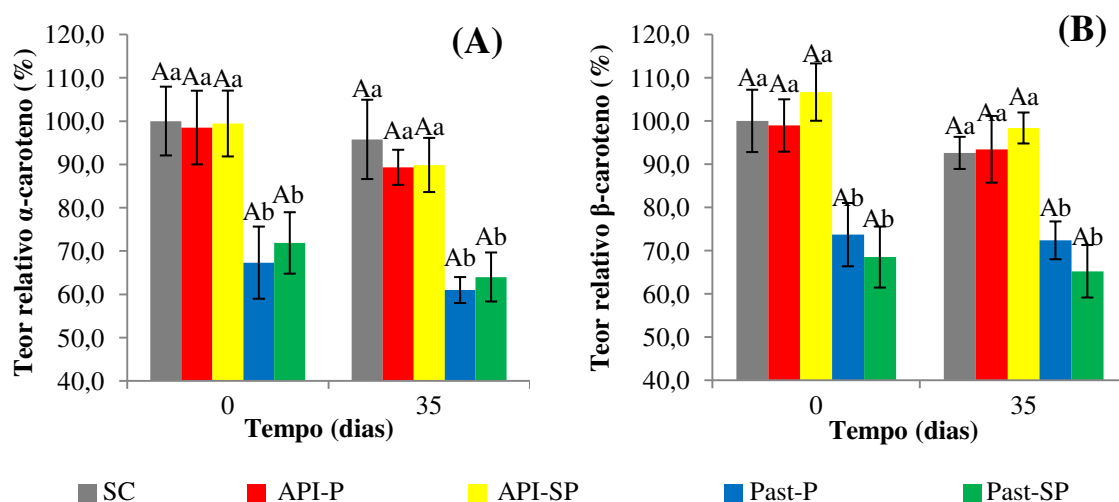


Figura 5. Avaliação do teor relativo de α -caroteno (A) e β -caroteno (B) de suco misto de manga e cenoura processado por API e pasteurizado com ou sem adição de *L. plantarum*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre as amostras no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do tempo para cada amostra.

3.6. Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD)

Enzimas como polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) têm um impacto considerável nas características de cor, viscosidade e sabor de frutas, vegetais e seus produtos processados (TEIXEIRA et al., 2013; TEREFE; BUCKOW; VERSTEEG, 2014). No presente estudo, verificou-se que a pasteurização causou redução na atividade

das enzimas PPO e POD ($p < 0,05$) (Figuras 6A e 6B). Por outro lado, apesar da redução na atividade de PPO promovida pela API, observou-se que a atividade de POD foi aumentada em cerca de 30 % quando os sucos foram processados por API ($p < 0,05$) (Figura 6B).

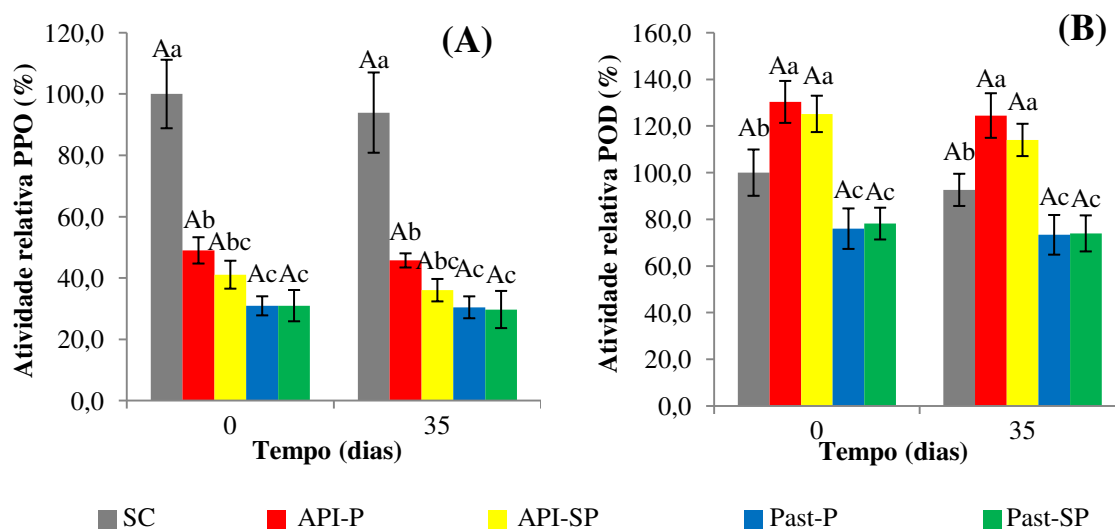


Figura 6. Atividade relativa de polifenoloxidase (PPO) (A) e peroxidase (POD) (B) de suco misto de manga e cenoura processado por API e pasteurizado com ou sem *L. plantarum*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Segundo Yi et al. (2017), a API pode aumentar a capacidade de extração ou ainda causar modificações na estrutura secundária e terciária das enzimas. Estas alterações conformacionais podem aumentar ou diminuir a atividade enzimática, alterando sua especificidade ao substrato e modificando sua funcionalidade (KNORR et al., 2011; TEREFE; BUCKOW; VERSTEEG, 2014), o que explica o resultado do presente estudo.

Huang et al. (2013) observaram ativação de PPO e POD em néctar de damasco após pressurização a 300, 400 e 500 MPa por 5-20 minutos à 34-40 °C, sendo que o maior aumento da atividade de POD foi observado a 500 MPa/5 min/40 °C, já para a PPO, essas condições foram as que causaram o menor aumento. Em comparação com a API, a pasteurização (110 °C/8,6 s) induziu a inativação completa de PPO e POD em néctar de damasco (HUANG et al., 2013).

De acordo com Aaby et al. (2018), a estrutura da enzima que foi modificada pela pressurização pode regenerar e a atividade de PPO aumentar ao longo do tempo. No entanto, isso não foi verificado no presente estudo, uma vez que não houve variação da atividade enzimática após 35 dias de armazenamento ($p>0,05$), provavelmente as alterações promovidas pelos diferentes processos na estrutura das enzimas se tornaram irreversíveis.

3.7. Análise Sensorial

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da avaliação sensorial dos sucos mistos potencialmente probióticos ou não, processados por API e pasteurizados. Verificou-se que o método de conservação aplicado e a adição de *L. plantarum* não influenciaram no atributo cor dos sucos mistos ($p>0,05$) (Tabela 3). Em contrapartida, para os atributos aroma e sabor, houve uma maior aceitação dos sucos mistos que foram processados por API independente da presença do probiótico e, para o sabor, o suco misto pasteurizado sem adição de *L. plantarum* não se diferiu do suco pressurizado com a adição de *L. plantarum* ($p>0,05$). Para a impressão global, verificou-se que os sucos processados por API obtiveram a maior aceitação pelos consumidores ($p<0,05$), sendo o suco misto pressurizado sem a adição do probiótico o que apresentou a maior média ($p<0,05$).

Tabela 3. Aceitação sensorial de suco misto probiótico processado por API e pasteurizado

Amostra	Atributos			
	Cor	Aroma	Sabor	Impressão Global
API com <i>L. plantarum</i>	8,2 ± 0,6 a	7,6 ± 0,5 a	7,2 ± 0,7 ab	7,5 ± 0,5 b
API sem <i>L. plantarum</i>	8,2 ± 0,6 a	8,0 ± 0,5 a	7,9 ± 0,6 a	8,0 ± 0,4 a
Pasteurizado com <i>L. plantarum</i>	8,1 ± 0,7 a	6,3 ± 0,8 b	6,1 ± 0,7 c	6,4 ± 0,6 c
Pasteurizado sem <i>L. plantarum</i>	8,2 ± 0,7 a	6,9 ± 0,8 b	6,7 ± 0,7 bc	6,6 ± 0,7 c

Letras minúsculas iguais na coluna não se diferem estatisticamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Moreita et al. (2017) encontraram resultados diferentes dos observados nesse estudo. Segundo os autores, os consumidores não detectaram diferença nos sucos adicionados de probiótico para os não adicionados para os atributos de cor, aroma,

sabor, acidez e impressão global. No entanto, similarmente constatado neste estudo, estes autores verificaram uma maior aceitação para os sucos processados por API.

Zhang et al. (2016) verificaram que suco de cenoura processado por API (500 MPa/6 min) apresentaram melhores notas em relação aos atributos aroma, sabor e aceitação global quando comparado com suco de cenoura pasteurizado (110 °C/8,6 s). Segundo Farkas; Hoover (2000), as altas pressões aplicadas na conservação dos alimentos pode ajudar a manter os compostos de aroma e sabor que são responsáveis pela qualidade sensorial dos alimentos.

4. Conclusão

A aplicação de API e pasteurização foram eficientes na manutenção da vida de prateleira de suco misto de manga e cenoura podendo ser aplicados industrialmente para conservação desse produto. No entanto, o processamento por API mostrou-se melhor que a pasteurização, uma vez que manteve as características sensoriais e nutricionais dos sucos.

Os métodos de conservação adotados não influenciaram a viabilidade de *L. plantarum* adicionado aos sucos, que apresentou altas contagens durante o armazenamento refrigerado, podendo ser considerado um alimento potencialmente probiótico.

A pasteurização provocou redução do teor de carotenoides e promoveu maior inativação das enzimas PPO e POD dos sucos.

Os sucos que foram produzidos por API tiveram maior aceitação sensorial do que os sucos pasteurizados. Desta forma, a API pode ser usada para produção de suco misto de manga e cenoura fornecendo um produto com boa qualidade nutricional e sensorial. A matriz testada se mostrou eficiente para a manutenção da viabilidade de *L. plantarum*, podendo ser uma alternativa para indivíduos que não consomem derivados lácteos.

5. Referências Bibliográficas

AABY, K.; GRIMSBO, I. H.; HOVDA, M. B.; RODE, T. M. Effect of high pressure and thermal processing on shelf life and quality of strawberry purée and juice. **Food Chemistry**, v. 260, n. 15, p. 115-123, 2018.

ABID, M.; JABBAR, S.; WU, T.; HASHIM, M. M.; HU, B.; LEI, S.; ZHANG, X.; ZENG, X. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 1182-1187, 2013.

- ALP, S.; BAKA, Z. M. Effects of probiotics on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels in orthodontic patients. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 154, n. 4, p. 517-523, 2018.
- ANDRÉS, V.; MATEO-VIVARACHO, L.; GUILLAMÓN, E.; VILLANUEVA, M. J.; TENORIO, M. D. High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 123-130, 2016.
- AUGUSTO, P. E. D.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. High Hydrostatic Pressure and High-Pressure Homogenization Processing of Fruit Juices. RAJAURIA, G.; TIWARI, B. K. (Ed.). In: **Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis**. Cap. 20, p. 393-421, 2018.
- BALASUBRAMANIAM, V. M.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I.; GUPTA, R. Principles and Application of High Pressure–Based Technologies in the Food Industry. **Annual Reviews in Food Science and Technology**, v. 6, p. 435-462, 2015.
- BARBA, F. J.; TEREFE, N. S.; BUCKOW, R.; KNORR, D.; ORLIEN, V. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. **Food Research International**, v. 77, p. 725-742, 2015.
- BATTISTINI, C.; GULLÓN, B.; ICHIMURA, E. S.; GOMES, A. M. P.; RIBEIRO, E. P.; KUNIGK, L.; MOREIRA, J. U. V.; JURKIEWICZ, C. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 303-309, 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan, 2001.
- CADENA, R. S.; CRUZ, A. G.; NETTO, R. R.; CASTRO, W. F.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. **Food Research International**, v. 54, p. 1670-1679, 2013.
- CANO, M. P.; HERNANDEZ, A.; ANCOS, B. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 85-88, 1997.
- CHEN, D.; PANG, X.; ZHAO, J.; GAO, L.; LIAO, X.; WU, J.; LI, Q. Comparing the effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on papaya beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 16-28, 2015.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; RODRIGUES, R. S. Estabilidade da vitamina c em néctar de acerola sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, p. 321-327, 2013.

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

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18-26, 2018.

FAASEMA, J.; ALAKALI, J.S.; ABU, J.O. Effects of storage temperature on 1-methylcyclopropene-treated mango (*Mangnifera indica*) fruit varieties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, p. 289-295, 2014.

FAGHFOORI, Z.; GARGARI, B. P.; GHARAMALEKI, A. S.; BAGHERPOUR, H.; KHOSROUSHAHI, A. Y. Cellular and molecular mechanisms of probiotics effects on colorectal cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 463-472, 2015.

FAO/WHO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization). **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.

FARAONI, A. S.; RAMOS, A. M.; GUEDES, D. B.; PINTO, M. R. M. R. Propriedades reológicas de sucos mistos de manga, goiaba e acerola adicionados de fitoquímicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 21-28, 2013.

FARKAS, D. F.; HOOVER, D. G. High pressure processing. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 47-64, 2000.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, p. 466-488, 2014.

FRATIANNI, A.; CINQUANTA, L.; PANFILI, G. Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 867-871, 2010.

GURMU, F.; HUSSEIN, S.; LAING, M. The potential of orange-fleshed sweet potato to prevent vitamin A deficiency in Africa. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 84, p. 65-78, 2014.

HESHMATI, J.; FARSI, F.; SHOKRI, F.; REZAEINEJAD, M.; ALMASI-HASHIANI, A.; VESALI, S.; SEPIDARKISH, M. A systematic review and meta-analysis of the probiotics and synbiotics effects on oxidative stress. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p. 66-84, 2018.

HUANG, W.; BI, X.; ZHANG, X.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J. Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic

pressure and high temperature short time. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.18, p. 74-82, 2013.

KNORR, D.; FROEHLING, A.; JAEGER, H.; REINEKE, K.; SCHLUETER, O.; SCHOESSLER, K. Emerging technologies in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 203-235, 2011.

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.

LI, L.; FENG, L.; YI, J.; HUA, C.; CHEN, F.; LIAO, X.; HU, X. High hydrostatic pressure inactivation of total aerobic bacteria, lactic acid bacteria, yeasts in sour Chinese cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 180-184, 2010.

LIU, S.; XU, Q.; LI, X.; WANG, Y.; ZHU, J.; NING, C.; CHANG, X.; MENG, X. Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical properties, enzymes activity, and antioxidant capacities of anthocyanins extracts of wild *Lonicera caerulea* berry. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 48-58, 2016.

LIU, F.; WANG, Y.; LI, R.; BI, X.; LIAO, X. Effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on antioxidant activity, antioxidant compounds and color of mango nectars. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 21, p. 35-43, 2014.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JUNIOR, B. R. C. Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 540-548, 2016.

MATHEYAMBATH, A. C.; SUBRAMANIAN, J.; PALIYATH, G. Mangoes. **Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health**, p. 641-645, 2016. doi: 10.1016 / B978-0-12-384947-2.00442-6

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudos com consumidores**. 3 ed. Viçosa: Editora UFV. 2013, 332p.

MOREIRA, R. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. C.; MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; CRISTIANINI, M.; CAMPOS, A. N. R.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, V. R. O.; CANUTO, J. W.; OLIVEIRA, D. C.; PEREIRA, D. C. S. Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 259-268, 2017.

- NAIDU, K. S. B.; ADAM, J. K.; GOVENDER, P. The use of probiotics and safety concerns: a review. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 6871-6877, 2012.
- NEMATOLLAHI, A.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49-53, 2016.
- NGAMWONGLUMLERT, L.; DEVAHASTIN, S. Carotenoids. **Reference Module in Food Science**, 2018
- NUÑO-LÁMBARRI, N.; CHÁVEZ-TAPIA, N. C.; URIBE, M. Food for Liver Health: Probiotics. **Reference Module in Food Science**, 2018.
- OLIVEIRA, P. M.; RAMOS, A. M.; MARTINS, E. M. F.; VIEIRA, E. N. R.; SOARES, A. S.; NORONHA, M. C.. Comparison of vacuum impregnation and soaking techniques for addition of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to minimally processed melon. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2547-2554, 2017.
- OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; E MARTÍN BELLOSO, O. Stability of health-related compounds in plant foods through the application of non thermal processes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, p. 111-123, 2012.
- PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 415-422, 2015.
- PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; STRINGHETA, P. C.; BRANDÃO, S. C. C.; PÁEZ, H. H.; QUEIRÓZ, V. M. V. Evaluation of total carotenoids, alfa and beta-carotene in carrots (*Daucus carota* L.) during home processing. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.
- PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Gut microbiota and central nervous system development. **Journal of Infection**, v. 73, n. 6, p. 536-546, 2016.
- RANADHEERA, C. S.; VIDANARACHCHI, J. K.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G.; AJLOUNI, S. Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. **Fermentation**, v. 3, n. 67, p. 1-17, 2017.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231- 1237, 1999.
- RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of**

foods. 4.ed. Washington: American Public Health Association - APHA, p. 483-495, 2001.

RIGANAKOS, K. A.; KARABAGIAS, I. K.; GERTZOU, I.; STAHL, M. Comparison of UV-C and thermal treatments for the preservation of carrot juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 42, p. 165-172, 2017.

RODRIGUES, D. B.; MERCADANTE, A. Z.; MARIUTTI, L. R. B. Marigold carotenoids: Much more than lutein esters. *Food Research International*, *in press*, 2018.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M. H.; ROCHA-SANTOS, T.; FREITAS, A. C. Storage stability of *Lactobacillus paracaseias* free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. **Food Bioprocess and Technology**, v. 5, p. 2748-2757, 2012.

RODRÍGUEZ, Y. M.; MUNIZ, C. A.; OLIVAS, G. I.; BELTRÁN, J. G.; ALIAGA, D. R.; SEPÚLVEDA, D. R. High Hydrostatic Pressure Processing of Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p. 399-416, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T. C.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, v. 40, p. 615-624, 1976.

SÁNCHEZ, C.; BARANDA, A. B.; MARAÑÓN, M. The effect of high pressure and high temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. **Food Chemistry**, v. 163, p. 37-45, 2014.

SAVEDBOWORN, W.; NIYOMRAT, S.; NAKNOVN, J.; PHATTAYAKORN, K. Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract. **Agriculture and Natural Resources**, *in press*, p. 1-7, 2018.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1-8, 2016.

TEIXEIRA, L. J. Q.; FORTUNY, R. S.; RAMOS, A. M.; BELLOSO, O. M. Kinetics of peroxidase inactivation in carrot juice treated with pulsed electric fields. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 2, p. 222-228, 2013.

TEREFE, N. S.;BUCKOW, R.; VERSTEEG, C. Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: Effects of novel food processing technologies, part 1: High-pressure processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 24-63, 2014.

TRIBST, A. A. L.; LEITE JUNIOR, B. R. C.; OLIVEIRA, M. M.; CRISTIANINI, M. High pressure processing of cocoyam, Peruvian carrot and sweet potato: Effect on oxidative enzymes and impact in the tuber color. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 302-309, 2016.

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

YI, J.; KEBEDE, B. T.; DANG, D. N. H.; BUVÉ, C.; GRAUWET, T.; LOEY, A. V.; HU, X.; HENDRICKX, M. Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 85-92, 2017.

ZHANG, Y.; LIU, X. C.; WANG, Y.; ZHAO, F.; SUN, Z.; LIAO, X. Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 135-144, 2016

ZHAO, L.; WANG, Y.; QIU, D.; LIAO, X. Effect of ultrafiltration combined with high-pressure processing on safety and quality features of fresh apple juice. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, 3246-3258, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

Suco misto de manga e cenoura é uma ótima matriz para o carreamento de bactérias probióticas, principalmente o suco com maior proporção de fibras em sua composição. Os resultados mostraram que a composição do meio influencia diretamente na viabilidade dos probióticos e, dentre os micro-organismos estudados, *L. plantarum* é o que apresentou maior capacidade de adaptação as diferentes formulações, apresentando altas contagens e boa resistência as condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

A aplicação da pasteurização ou API nos sucos não afeta a viabilidade de *L. plantarum*, que manteve contagens acima de 8 log UFC/mL, mesmo após o armazenamento refrigerado.

O processamento por API mostrou-se melhor que a pasteurização na manutenção das características nutricionais e sensoriais dos sucos. Em contrapartida, a pasteurização promoveu maior inativação de enzimas indesejáveis ao produto.

Suco misto de manga e cenoura pasteurizado ou processado por API adicionado de *L. plantarum* é um novo produto, com potencial efeito probiótico, que pode ser uma alternativa para a população que não consome derivados lácteos, seja por questões de saúde ou filosofia de vida.